

P-ISSN 1859-4794 * E-ISSN 2615-9929

TẬP 66, SỐ 5, THÁNG 5 NĂM 2024
VOLUME 66, NUMBER 5, MAY 2024

TẠP CHÍ KHOA HỌC & CÔNG NGHỆ

Vietnam Journal of Science and Technology - MOST VIỆT NAM



HỘI ĐỒNG BIÊN TẬP

Chủ tịch

Châu Văn Minh - Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam, Việt Nam

Thành viên

Nguyễn Việt Anh - Trường Đại học Xây dựng, Việt Nam

Bùi Chí Bửu - Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp miền Nam, Việt Nam

Vũ Dũng - Hội Tâm lý học Việt Nam, Việt Nam

Trần Thọ Đạt - Trường Đại học Kinh tế Quốc dân, Việt Nam

Nguyễn Đình Đức - Trường Đại học Công nghệ, Đại học Quốc gia Hà Nội, Việt Nam

Vũ Minh Giang - Đại học Quốc gia Hà Nội, Việt Nam

Trương Nam Hải - Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam, Việt Nam

Trần Thanh Hải - Trường Đại học Mở - Địa chất, Việt Nam

Phạm Huy Khang - Trường Đại học Giao thông Vận tải, Việt Nam

Phạm Gia Khánh - Hội Ghép tạng Việt Nam, Việt Nam

Hồ Đắc Lộc - Trường Đại học Công nghệ TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Nguyễn Thị Mỹ Lộc - Trường Đại học Giáo dục, Đại học Quốc gia Hà Nội, Việt Nam

Bành Tiến Long - Đại học Bách khoa Hà Nội, Việt Nam

Lê Quan Nghiêm - Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Mai Trọng Nhuận - Đại học Quốc gia Hà Nội, Việt Nam

Trần Hữu Phúc - Hội đồng Giáo sư Nhà nước, Việt Nam

Nguyễn Thanh Phương - Trường Đại học Cần Thơ, Việt Nam

Nguyễn Thanh Thủy - Trường Đại học Công nghệ, Đại học Quốc gia Hà Nội, Việt Nam

Phạm Hùng Việt - Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, Việt Nam

Tổng biên tập

Nguyễn Thị Hương Giang - Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

Phó Tổng biên tập

Phạm Thị Minh Nguyệt - Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

Ban biên tập

Phí Công Thường - Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

Vũ Văn Hưng - Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

Ninh Văn Diện - Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

Lê Thị Bắc - Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

Tăng Xuân Bình - Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

Lê Thị Tuyết Hạnh - Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

Trương Thị Thảo Dương - Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

EDITORIAL BOARD

Chairman

Chau Van Minh - Vietnam Academy of Science and Technology, Vietnam

Members

Nguyen Viet Anh - National University of Civil Engineering, Vietnam

Bui Chi Bui - Institute of Agricultural Science for Southern Vietnam, Vietnam

Vu Dung - Vietnam Association of Social Psychology, Vietnam

Tran Tho Dat - National Economics University, Vietnam

Nguyen Dinh Duc - University of Engineering and Technology, VNU, Hanoi, Vietnam

Vu Minh Giang - VNU, Hanoi, Vietnam

Truong Nam Hai - Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology, Vietnam

Tran Thanh Hai - Hanoi University of Mining and Geology, Vietnam

Pham Huy Khang - University of Transport and Communications, Vietnam

Pham Gia Khanh - Vietnam Society of Organ Transplantation, Vietnam

Ho Duc Loc - Ho Chi Minh City University of Technology, Vietnam

Nguyen Thi My Loc - University of Education, VNU, Hanoi, Vietnam

Banh Tien Long - Hanoi University of Science and Technology, Vietnam

Le Quan Nghiem - University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh City, Vietnam

Mai Trong Nuan - VNU, Hanoi, Vietnam

Tran Huu Phuc - The State Council for Professorship, Vietnam

Nguyen Thanh Phuong - Can Tho University, Vietnam

Nguyen Thanh Thuy - University of Engineering and Technology, VNU, Hanoi, Vietnam

Pham Hung Viet - University of Science, VNU, Hanoi, Vietnam

Editor-in-Chief

Nguyen Thi Huong Giang - Ministry of Science and Technology, Vietnam

Deputy Editor-in-Chief

Pham Thi Minh Nguyệt - Ministry of Science and Technology, Vietnam

Managing Editors

Phi Cong Thuong - Ministry of Science and Technology, Vietnam

Vu Van Hung - Ministry of Science and Technology, Vietnam

Ninh Van Dien - Ministry of Science and Technology, Vietnam

Le Thi Bac - Ministry of Science and Technology, Vietnam

Tang Xuan Binh - Ministry of Science and Technology, Vietnam

Le Thi Tuyen Hanh - Ministry of Science and Technology, Vietnam

Truong Thi Thao Duong - Ministry of Science and Technology, Vietnam

TÒA SOẠN

113 Trần Duy Hưng - Cầu Giấy - Hà Nội - Việt Nam

Tel: (84.24) 39436793; Fax: (84.24) 39436794

Email: khoahocvacongnghevietnam@most.gov.vn

Tạp chí điện tử: b.vjst.vn

GIẤY PHÉP XUẤT BẢN

Số 459/GP-BTTTT ngày 20/7/2021

Số 50/GP-BTTTT ngày 01/02/2023

Giá: 18000^d

EDITORIAL OFFICE

113 Tran Duy Hung Str. - Cau Giay Dist. - Hanoi - Vietnam

Tel: (84.24) 39436793; Fax: (84.24) 39436794

Email: khoahocvacongnghevietnam@most.gov.vn

E-journal: b.vjst.vn

PUBLICATION LICENCE

No. 459/GP-BTTTT 20th July 2021

No. 50/GP-BTTTT 1st February 2023

Phân tích biểu hiện một số cytokine và yếu tố tăng trưởng tế bào trong dịch não tủy của bệnh nhân rối loạn cơ tròn, viêm tủy cắt ngang và liệt

Thân Thị Trang Uyên^{1*}, Trịnh Phương Đông^{1, 2}, Nguyễn Thu Huyền¹, Hoàng Hương Diễm¹, Nguyễn Thanh Liêm³

¹Trung tâm Công nghệ cao, Công ty Cổ phần Bệnh viện Đa khoa Quốc tế Vinmec, 458 Minh Khai, phường Vĩnh Tuy, quận Hai Bà Trưng, Hà Nội, Việt Nam

²Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, 334 Nguyễn Trãi, phường Thanh Xuân Trung, quận Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

³Viện Nghiên cứu Tế bào gốc và Công nghệ gen Vinmec, Công ty Cổ phần Bệnh viện Đa khoa Quốc tế Vinmec, 458 Minh Khai, phường Vĩnh Tuy, quận Hai Bà Trưng, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 10/5/2023; ngày chuyển phản biện 12/5/2023; ngày nhận phản biện 29/5/2023; ngày chấp nhận đăng 3/6/2023

Tóm tắt:

Các nghiên cứu gần đây cho thấy có sự liên quan giữa mức độ biểu hiện của cytokine và yếu tố tăng trưởng với các bệnh lý khác nhau, trong đó có tổn thương thần kinh. Trong nghiên cứu này, chúng tôi thu thập dịch não tủy (DNT) của các bệnh nhân viêm/tổn thương thần kinh gồm rối loạn cơ tròn (RLCT), viêm tủy cắt ngang (VTCN) và liệt để phân tích sự biểu hiện của 22 cytokine và yếu tố tăng trưởng bằng phương pháp phân tích miễn dịch đa mục tiêu (Luminex). Kết quả cho thấy, trong DNT của bệnh nhân RLCT, VTCN và liệt có sự biểu hiện của cả 22 yếu tố, gồm có 10 cytokine gây viêm, 6 cytokine chống viêm và 6 yếu tố tăng trưởng. Các cytokine gây viêm GM-CSF, IL-6 và TNF- α ; cytokine kháng viêm APRIL và ST2 (IL-33R); yếu tố tăng trưởng GDF-15 và G-CSF có mức độ biểu hiện cao hơn các yếu tố khác trong nhóm phân loại chức năng. Nhóm các yếu tố biểu hiện thấp hơn so với yếu tố khác trong nhóm phân loại chức năng gồm có cytokine gây viêm (IL-1 β và IFN- γ), cytokine kháng viêm (IL-10 và BAFF) và yếu tố tăng trưởng (BMP-9, EGF, NGF- β). Đáng chú ý, 2 yếu tố IL-6 và GDF-15 biểu hiện cao hơn ở bệnh nhân liệt so với RLCT và VTCN, trong khi IL-17A và TNF- α chỉ biểu hiện cao hơn ở bệnh nhân liệt so với VTCN chứ không cao hơn bệnh nhân RLCT. 2 yếu tố IL-21 và TNF- α lại có biểu hiện cao hơn ở bệnh nhân RLCT so với VTCN. Đây là các kết quả mới, có ý nghĩa quan trọng đóng góp vào cơ sở dữ liệu về mức độ biểu hiện cytokine và yếu tố tăng trưởng trong DNT của bệnh nhân RLCT, VTCN và liệt. Tuy nhiên, cần phải nghiên cứu thêm để có thể phát triển kết quả thành các chỉ thị cho từng loại bệnh.

Từ khóa: cytokine, liệt, rối loạn cơ tròn, viêm tủy cắt ngang, yếu tố tăng trưởng.

Chỉ số phân loại: 3.1

1. Đặt vấn đề

Trong 3 thập kỷ vừa qua, các bệnh thần kinh như RLCT do thoát vị màng não - tủy, VTCN và liệt đã gây ra những thách thức đối với người bệnh, gia đình và toàn xã hội. Trong đó, RLCT là bệnh lý gây ra do hậu quả của một dạng khuyết tật ống thần kinh khi gai xương bị hở hay cột sống bị nứt tạo khe hở trên đốt sống và có thể gây ra thoát vị màng não tủy [1]. Hậu quả nghiêm trọng nhất của RLCT do nứt đốt sống có thể bao gồm suy yếu cơ hoặc liệt ở phần do cột sống bị nứt điều khiển, có thể dẫn đến mất khả năng kiểm soát bàng quang và đại tràng. Một số nghiên cứu cho thấy, 42,2-71,2% các bệnh nhân mắc thoát vị màng não tủy sẽ dẫn đến rối loạn chức năng ruột (đại tiện, tiểu tiện không tự chủ hoặc táo bón) [2-5]. Hậu quả là có thể gây hại cho thận và ảnh hưởng rất nhiều đến chất lượng sống của người bệnh, gây cho họ cảm giác xấu hổ, trầm cảm và tự cách ly bản thân với xã hội.

VTCN là tình trạng viêm cả hai bên của một đoạn tủy sống, thường làm hỏng lớp vật liệu cách điện bao bọc các sợi tế bào thần kinh, hậu quả là làm gián đoạn các tín hiệu mà các dây thần kinh tủy sống gửi đi khắp cơ thể. Dấu hiệu của VTCN là sự xâm nhập của tập hợp các tế bào lympho và bạch cầu đơn nhân vào các đoạn của tủy sống với các mức độ khử myelin khác nhau, chiếm không gian quanh mạch, cũng như ảnh hưởng đến hoạt động của các tế bào thần kinh đệm [6, 7]. Ở những trường hợp bệnh nghiêm trọng,

có thể quan sát thấy các tổn thương viêm dây thần kinh thực vật có các lắng đọng của globulin miễn dịch và bổ thể xung quanh các mạch máu nhỏ và hoại tử [6, 8]. Điều này có thể gây đau, yếu cơ, tê liệt và rối loạn các vấn đề về cảm giác hoặc rối loạn chức năng bàng quang và ruột. Có khoảng 60% các trường hợp mắc viêm tủy cắt ngang vẫn chưa rõ nguyên nhân, 40% còn lại liên quan đến các rối loạn tự miễn như đa xơ cứng, viêm thần kinh tủy, lupus ban đỏ hệ thống, hội chứng Sjogren, bệnh Sarcoidosis và các bệnh khác. Mặc dù rối loạn có thể phát triển ở mọi lứa tuổi, nhưng tỷ lệ mắc bệnh đạt ngưỡng cao nhất ở hai mức tuổi là 10-19 và 30-39 [9].

Trong khi đó, liệt là tình trạng mất khả năng kiểm soát một cơ hoặc một nhóm cơ trong một bộ phận của cơ thể. Nguyên nhân dẫn đến liệt có thể do bất kỳ phần nào của hệ thống chuyển tiếp tín hiệu thần kinh hoặc bộ phận xử lý thông tin tín hiệu thần kinh - chẳng hạn như não, tủy sống, dây thần kinh hoặc điểm nối giữa dây thần kinh và cơ - bị hư hỏng, các tín hiệu di chuyển sẽ không đến được các cơ và dẫn đến tê liệt. Một trong số các nguyên nhân của liệt là do tổn thương dây thần kinh cấp điều khiển hoạt động. Ví dụ, hội chứng Guillain-Barre do những tổn thương ở các dây thần kinh gây ra trực tiếp bởi virus hoặc gián tiếp thông qua sự đáp ứng miễn dịch quá mức với các kháng nguyên virus [10], hoặc hội chứng liệt ở người Trung Quốc (thường gặp ở 88/90 bệnh nhân có biểu hiện liệt cấp tính tại phía bắc Trung Quốc). Dị tật bẩm sinh như tật nứt đốt sống xảy ra khi não, tủy sống và/hoặc lớp bao

*Tác giả liên hệ: Email: v.uyenttt@vinmec.com

Analysis of expression level of several cytokines and growth factors in cerebrospinal fluids extracted from spina bifida, transverse myelitis, and paralysis

Thi Trang Uyen Than^{1*}, Phuong Dong Trinh^{1,2},
Thu Huyen Nguyen¹, Huong Diem Hoang¹,
Thanh Liem Nguyen³

¹HiTech Center, Vinmec Healthcare System,

458 Minh Khai Street, Vinh Tuy Ward, Hai Ba Trung District, Hanoi, Vietnam

²Faculty of Biology, University of Science, Vietnam National University - Hanoi,

334 Nguyen Trai Street, Thanh Xuan Trung Ward, Thanh Xuan District, Hanoi, Vietnam

³Vinmec Research Institute of Stem Cell and Gene Technology, Vinmec Healthcare System,

458 Minh Khai Street, Vinh Tuy Ward, Hai Ba Trung District, Hanoi, Vietnam

Received 10 May 2023; revised 29 May 2023; accepted 3 June 2023

Abstract:

Recent studies have indicated that there is an association between expression levels of cytokines and growth factors with different pathologies, including neuron damage disease. In this study, we used Luminex assay to analyse expression levels of several cytokines and growth factors in cerebrospinal fluids (CSF) of patients with neuron inflammation or damage including spina bifida (SB), transverse myelitis (TM), and paralysis. Results showed that we had detected the expression of 22 factors, including ten inflammatory cytokines, six anti-inflammatory cytokines, and six growth factors, in the CSF isolated from patients. A group of factors expressed higher compared to others, including inflammatory cytokines (GM-CSF, IL-6, and TNF- α); anti-inflammatory cytokines (APRIL and IL-33R); and growth factors (GDF-15 và G-CSF). A group of factors that expressed lower compared to other factors includes inflammatory cytokines (IL-1 β và IFN- γ), anti-inflammatory cytokines (IL-10 and BAFF), and growth factors (BMP-9, EGF, and NGF- β). Interestingly, two factors of IL-6 and GDF-15 expressed higher in CSF originated from paralysis patients compared to SB and TM patients, while IL-17A and TNF- α expressed higher in paralysis patients compared to TM, but not SB. Two factors of IL-21 and TNF- α expressed higher in CSF from SB compared to TM. Results from this study are novel and significant to contribute to the knowledge of cytokine and growth factor profiles in the CSF of SB, TM, and paralysis patients. However, it requires more investigation to develop these results into markers for disease diagnosis.

Keywords: cytokines, growth factors, paralysis, spina bifida, transverse myelitis.

Classification number: 3.1

bọc bảo vệ chúng không hình thành đúng cách có thể dẫn đến liệt bẩm sinh. Một nghiên cứu tiến hành khảo sát dân số bại liệt do Quỹ Christopher và Dana Reeve tài trợ và Trung tâm Phát triển và Người khuyết tật của Đại học New Mexico triển khai cho thấy, có gần 1/50 người Mỹ đang sống chung với một dạng liệt - tương đương với khoảng 6 triệu người trên tổng dân số [11].

Gần đây, có nhiều nghiên cứu hướng đến tìm hiểu mối tương quan của hệ miễn dịch với bệnh tổn thương thần kinh. Nhiều bằng chứng cho rằng các cytokine viêm tăng cao có liên quan đến sự hiện diện của cơn đau sau tổn thương dây thần kinh, trong khi các cytokine chống viêm có liên quan đến việc điều hòa hệ thống miễn dịch và giảm đau thần kinh [4, 12]. Một số nghiên cứu với cytokine huyết thanh ở đối tượng bệnh nhân mắc VTCN cho thấy, IL-6 có thể đóng vai trò quan trọng do nó có liên quan đến sự tồn tại của các tế bào tạo ra kháng thể chống AQP4 trong tuần hoàn ngoại vi và tăng cường phản ứng viêm ở hệ thần kinh trung ương [13]. Bên cạnh đó, IL-6 tăng cao hơn trong dịch não tủy của bệnh nhân VTCN so với DNT của các bệnh lý thần kinh có nguyên nhân không phải viêm thần kinh [14, 15]. Ngoài ra trên đối tượng RLCT do viêm màng tủy, nồng độ IL-6 và TNF- α trong huyết thanh của trẻ mới sinh mắc bệnh tăng cao so với trẻ mới sinh bình thường, và do đó cho rằng có thể sử dụng IL-6 và TNF- α làm dấu ấn chỉ thị cho bệnh viêm màng não tủy [16]. Việc đánh giá mối tương quan giữa các cytokine và các bệnh tổn thương thần kinh là cần thiết để phát triển thành chất chỉ thị và tiên lượng bệnh, từ đó hướng đến những phương pháp điều trị phù hợp.

Mặc dù đã có một số nghiên cứu về biểu hiện cytokine trong huyết thanh của bệnh nhân RLCT, VTCN và liệt, tuy nhiên chưa có nghiên cứu nào so sánh trực tiếp mức độ biểu hiện của cytokine và yếu tố tăng trưởng trong DNT của 3 loại bệnh này. Do vậy, chúng tôi tiến hành thu thập DNT và đánh giá biểu hiện của một số cytokine viêm, cytokine kháng viêm và yếu tố tăng trưởng của 3 loại bệnh nhân này nhằm tìm ra yếu tố khác biệt đặc trưng cho từng bệnh. Bên cạnh đó, trước đây việc tiến hành đo nồng độ các cytokine trong mẫu máu được thực hiện bằng phương pháp xét nghiệm miễn dịch hấp thụ liên kết với Enzyme (ELISA) [13, 16]. Tuy nhiên, ELISA chỉ có thể được sử dụng để phát hiện một cytokine trong một lần đo mẫu, trong khi đó Luminex có thể khắc phục được điểm yếu này và có thể phát hiện được nhiều cytokine trong cùng một lượng mẫu nhỏ. Do vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng kỹ thuật Luminex để phát hiện và đánh giá biểu hiện của các cytokine và yếu tố tăng trưởng trong mẫu dịch não tủy của bệnh nhân RLCT, VTCN và liệt.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Thu thập dịch não tủy

Bệnh nhân mắc RLCT do thoát vị màng não tủy, VTCN và liệt được tiến hành rút DNT trước khi truyền vào lượng dịch tế bào gốc tự thân tương ứng để duy trì áp lực nội sọ. Mẫu DNT là chất thải y tế và được thu lại. Bệnh nhân được thông báo và cho ký giấy đồng thuận trước khi tiến hành thu mẫu.

Quy trình lấy mẫu được bác sỹ thực hiện theo các bước: gây mê, rút DNT tại khe giữa đốt sống thắt lưng thứ 4 và 5 sử dụng kim tiêm 18 G, chuyển dịch sang ống ly tâm 15 ml và dán nhãn mã bệnh nhân. Sau đó, mẫu DNT sẽ được vận chuyển về phòng thí nghiệm để xử lý các bước tiếp theo.

2.2. Xử lý dịch não tủy và bảo quản

Mẫu DNT sau khi thu thập được chuyển về phòng thí nghiệm và xử lý theo quy trình gồm các bước: ly tâm 400 vòng/10 phút/4°C, thu dịch nổi là phần DNT sử dụng cho nghiên cứu và chia vào các ống bảo quản polypropylen 1 ml với thể tích 500 µl dịch nổi/ống. Tiếp đó tiến hành dán mã vạch thông tin mẫu và bảo quản ở nhiệt độ -80°C cho đến khi tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

Cặn còn lại (sau khi đã thu dịch nổi) được hòa tan trong 100 µl dịch để đếm tế bào. Số lượng tế bào (đơn vị: tế bào) được tính toán theo công thức sau:

Số lượng tế bào = (Tổng số tế bào ở 4 buồng đếm/4) × 10.000 × 0,1 trong đó, 10.000 là thể tích buồng đếm (mm³); 0,1 là độ pha loãng (dung dịch ban đầu được cô lại).

2.3. Định lượng nồng độ protein

Nồng độ cytokine và các yếu tố tăng trưởng trong DNT của bệnh nhân RLCT, VTCN và liệt được định lượng bằng bộ kit Human Custom Procartaplex Multiplex Panel 22-Plex (Thermo Fisher) trên thiết bị Luminex™200. Bộ kit được thiết kế để phân tích các cytokine gây viêm, chống viêm và yếu tố tăng trưởng, gồm có: GM-CSF, IFN-γ, TNF-α, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-21, IL-31, IL-33R, BAFF, APRIL, NGF-β, BMP-9, EGF, GDF-15, G-CSF, M-CSF.

Các hoá chất theo bộ kit được chuẩn bị theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Nguyên lý hoạt động của bộ kit dựa trên sự bắt cặp protein của mẫu cần phân tích với hai lớp kháng thể là kháng thể bắt giữ được gắn trên các hạt từ và kháng thể phát hiện được gắn biotin. Các thao tác được thực hiện trên đĩa 96 giếng. Sau khi ủ mẫu và hạt từ, đặt đĩa 96 giếng lên bề mặt của đĩa nam châm để giữ lại hạt từ đã gắn kháng thể bắt giữ và tương tác với protein đích lại, rửa loại bỏ mẫu thừa và các protein không tương tác bám vào hạt từ. Tiếp theo, bổ sung kháng thể phát hiện có gắn biotin đặc hiệu với protein trong mẫu cần phân tích. Liên hợp Phycoerythrin (PE) Streptavidin hoạt động như phân tử phát huỳnh quang được bổ sung để bắt cặp với kháng thể phát hiện thông qua cầu nối Streptavidin - Biotin. Đo tín hiệu huỳnh quang trên hệ thống Luminex™200 để xác định sự có mặt và số lượng kháng nguyên. Kết quả thu được ở file Batch sẽ được đọc trên phần mềm ProCartaPlex Analyst 1.0. Kết quả định lượng sẽ được tính toán và kiểm định dựa vào đường chuẩn được dựng dựa trên chất chuẩn cung cấp cùng bộ kit.

2.4. Phân tích thống kê và xử lý số liệu

Hàm lượng protein phát hiện được trong DNT của bệnh nhân sẽ được phân tích và báo cáo dưới dạng giá trị số trung bình (TB) ±SD. Phân tích thống kê và vẽ hình trên phần mềm GraphPad Prism version 9 (Hoa Kỳ). Giá trị p<0,05 được xem là so sánh khác biệt có giá trị thống kê.

3. Kết quả

3.1. Đặc điểm dịch não tủy thu được

Mẫu DNT thu được là phần dịch hút ra trước khi tiêm tế bào gốc nên thể tích dịch sẽ phụ thuộc vào thể tích của dịch tế bào truyền vào. Mẫu thu được sẽ được xử lý để loại bỏ tế bào và bảo quản cho mục đích phân tích nồng độ protein (cytokine và chất tăng trưởng). Trước khi sử dụng DNT để phân tích cytokine, chúng tôi kiểm tra đặc điểm các mẫu DNT thu được sau ly tâm. Dữ liệu cho thấy, các mẫu DNT thu được không bị nhiễm tế bào máu đỏ nhưng có thấy xuất hiện tế bào đơn nhân. Điều này cho thấy rằng, trong quá trình hút DNT từ bệnh nhân, một phần tế bào trong dịch tủy có lẫn vào DNT trước khi xử lý. Việc xử lý loại bỏ tế bào lẫn vào nhằm đảm bảo cho chất lượng DNT đủ điều kiện để phân tích cytokine và yếu tố tăng trưởng bằng phương pháp Luminex (bảng 1).

Bảng 1. Đặc điểm các mẫu dịch não tủy thu được từ bệnh nhân rối loạn cơ tròn, viêm tủy cắt ngang và liệt.

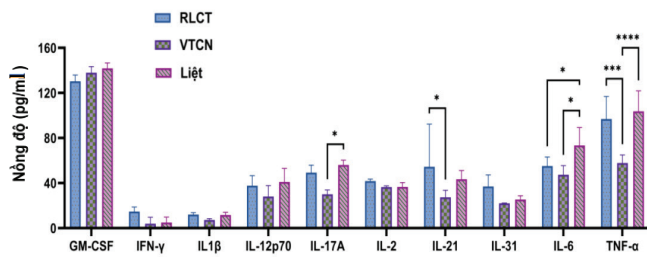
Mẫu DNT	RLCT	VTCN	Liệt
Số lượng mẫu (n)	5	2	5
Thể tích mẫu TB±SD (ml)	3,9±1,0	4,2±0,3	2,7±0,5
Tuổi bệnh nhân (TB (dải tuổi))	12,25 (6-20)	5,5 (5-6)	33,2 (18-45)
Nhiễm hồng cầu	Không	Không	Không
Nhiễm bạch cầu đơn nhân	Có	Có	Có

3.2. Biểu hiện của cytokine gây viêm

Để đánh giá biểu hiện của các cytokine gây viêm trong DNT của bệnh nhân RLCT, VTCN và liệt, chúng tôi sử dụng kỹ thuật Luminex để đánh giá mức độ biểu hiện nồng độ của 10 cytokine gây viêm, gồm có: GM-CSF, TNF-α, IL-1β, IFN-γ, IL-12p70, IL-17A, IL-2, IL-6, IL-21 và IL-31. Trong đó, GM-CSF biểu hiện cao nhất ở cả 3 loại bệnh, tiếp đến cao thứ 2 là TNF-α và thứ 3 là IL-6. Nhóm biểu hiện thấp nhất là IFN-γ và IL-1β. Nhóm biểu hiện trung bình là IL-12p70, IL-17A, IL-2, IL-21 và IL-31 (bảng 2, hình 1).

Bảng 2. Hàm lượng cytokine gây viêm trong dịch não tủy của bệnh nhân rối loạn cơ tròn, viêm tủy cắt ngang và liệt (pg/ml).

Cytokine gây viêm	RLCT (TB±SD)	VTCN (TB±SD)	Liệt (TB±SD)
GM-CSF	130,3±5,569	137,95±5,473	141,778±4,779
IFN-γ	14,694±4,037	3,98±5,628	5,052±4,701
IL-1 β	12,074±1,768	7,31±1,131	11,66±2,364
IL-12p70	37,724±8,901	28,075±9,779	41,004±12,062
IL-17A	49,266±6,718	30,055±3,394	56,054±4,246
IL-2	41,814±1,679	36,485±1,053	36,62±3,869
IL-21	54,45±37,874	27,35±6,307	43,404±7,760
IL-31	37,032±10,203	22,08±0,212	25,406±3,316
IL-6	55,124±8,044	47,365±8,111	73,334±15,938
TNF-α	96,812±20,078	57,82±7,184	103,67±18,162



Hình 1. Phân tích mức độ biểu hiện của các cytokine gây viêm sử dụng kỹ thuật Luminex. Mức độ biểu hiện khác nhau của các cytokine gây viêm và giữa các nhóm bệnh. Chỉ có IL-17A, IL-6, IL-21 và TNF- α biểu hiện khác nhau ở các nhóm bệnh trong khi các yếu tố khác không có biểu hiện khác nhau. *: chỉ $p < 0,05$; ***: chỉ $p < 0,001$; ****: chỉ $p < 0,0001$.

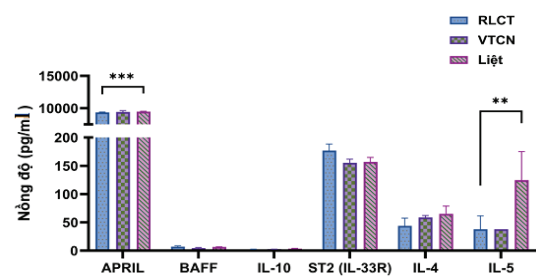
Khi đánh giá sự khác nhau của cytokine giữa 3 nhóm bệnh, hầu hết đều có biểu hiện không khác nhau trong DNT của bệnh nhân. Chỉ có 4 cytokine là IL-17A, IL-6, IL-21 và TNF- α là có sự khác biệt giữa các nhóm. Trong đó, 3 yếu tố là IL-17A, IL-6 và TNF- α biểu hiện cao hơn ở bệnh nhân liệt so với bệnh nhân VTCN. Bên cạnh đó, IL-6 biểu hiện cao hơn ở trong DNT của bệnh nhân liệt so với RLCT và TNF- α biểu hiện cao hơn trong DNT của bệnh nhân RLCT so với VTCN (hình 1).

3.3. Biểu hiện của cytokine chống viêm

Bên cạnh đánh giá hàm lượng cytokine gây viêm, chúng tôi cũng đánh giá mức độ biểu hiện của cytokine chống viêm trong DNT của bệnh nhân RLCT, VTCN và liệt. Kết quả cho thấy, trong số 6 yếu tố chống viêm được phân tích gồm có APRIL, BAFF, IL-10, ST2 (IL-33R), IL-4 và IL-5; yếu tố APRIL có biểu hiện cao nhất, tiếp đến là ST2 (IL-33R), IL-4, IL-5 và thấp nhất là BAFF và IL-10 (bảng 3, hình 2). IL-10 cũng là yếu tố biểu hiện thấp nhất trong tổng số 22 cytokine gây viêm, cytokine kháng viêm và yếu tố tăng trưởng được phân tích trong nghiên cứu này (bảng 3). Tuy nhiên, 6 cytokine chống viêm này không có biểu hiện khác nhau giữa 3 nhóm bệnh ngoại trừ APRIL và IL-5 đều biểu hiện cao hơn ở DNT của bệnh nhân liệt so với RLCT (hình 2).

Bảng 3. Hàm lượng cytokine chống viêm trong dịch não tủy của bệnh nhân rối loạn cơ tròn, viêm tủy cắt ngang và liệt (pg/ml).

Cytokine chống viêm	RLCT (TB $\pm$ SD)	VTCN (TB $\pm$ SD)	Liệt (TB $\pm$ SD)
APRIL	9352,618 $\pm$ 75,112	9277,62 $\pm$ 202,89	9464,726 $\pm$ 74,632
BAFF	7,182 $\pm$ 1,535	4,41 $\pm$ 1,245	6,56 $\pm$ 0,286
IL-10	2,338 $\pm$ 0,33	2,63 $\pm$ 0,127	3,578 $\pm$ 0,658
ST2 (IL-33R)	176,948 $\pm$ 11,516	155,3 $\pm$ 6,477	156,826 $\pm$ 8,077
IL-4	43,83 $\pm$ 13,613	58,925 $\pm$ 3,175	65,114 $\pm$ 13,677
IL-5	37,986 $\pm$ 23,681	38,05 $\pm$ 0,000	124,594 $\pm$ 50,457



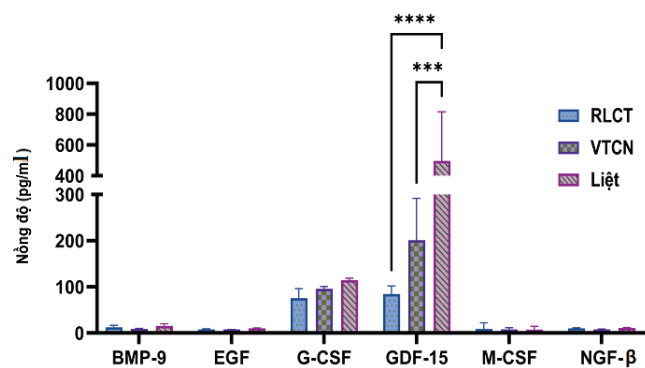
Hình 2. Phân tích mức độ biểu hiện của các cytokine chống viêm sử dụng kỹ thuật Luminex. Không có sự biểu hiện khác biệt về mức độ biểu hiện cytokine giữa các nhóm bệnh, ngoại trừ hai yếu tố APRIL và IL-5 có biểu hiện cao hơn ở trong DNT của bệnh nhân liệt so với RLCT. **: chỉ $p < 0,01$; ***: chỉ $p < 0,001$.

3.4. Biểu hiện của yếu tố tăng trưởng

Mức độ biểu hiện các yếu tố tăng trưởng cũng có thể phản ánh tình trạng bệnh lý của bệnh nhân. Do vậy, chúng tôi tiếp tục phân tích mức độ biểu hiện của 6 yếu tố tăng trưởng tế bào, gồm có: BMP-9, EGF, G-CSF, GDF-15, M-CSF và NGF- β . Kết quả cho thấy, GDF-15 biểu hiện cao nhất trong số các yếu tố được phân tích, tiếp theo là G-CSF, 2 yếu tố này biểu hiện cao hơn nhiều lần so với các yếu tố còn lại. Trong khi đó, các yếu tố BMP-9, EGF và NGF- β biểu hiện rất thấp và M-CSF biểu hiện thấp nhất. Khi phân tích về mức độ biểu hiện của yếu tố tăng trưởng giữa các nhóm bệnh, chỉ có GDF-15 biểu hiện khác biệt với nồng độ protein cao hơn được phát hiện ở DNT của bệnh nhân liệt so với trong DNT của bệnh nhân RLCT và VTCN (bảng 4, hình 3).

Bảng 4. Hàm lượng yếu tố tăng trưởng trong dịch não tủy của bệnh nhân rối loạn cơ tròn, viêm tủy cắt ngang và liệt (pg/ml).

Cytokine/GF	RLCT (TB $\pm$ SD)	VTCN (TB $\pm$ SD)	Liệt (TB $\pm$ SD)
BMP-9	12,35 $\pm$ 4,634	15,672 $\pm$ 4,281	8,715 $\pm$ 1,491
EGF	8,104 $\pm$ 1,328	10,018 $\pm$ 1,040	7,745 $\pm$ 0,233
G-CSF	75,396 $\pm$ 20,593	114,86 $\pm$ 4,031	95,695 $\pm$ 5,056
GDF-15	84,432 $\pm$ 17,578	497,056 $\pm$ 318,37	201,3 $\pm$ 90,184
M-CSF	21,825 $\pm$ 12,311	8,075 $\pm$ 3,203	12,370 $\pm$ 1,730
NGF- β	10,314 $\pm$ 1,363	10,922 $\pm$ 1,075	8,05 $\pm$ 0,636



Hình 3. Phân tích mức độ biểu hiện của các yếu tố tăng trưởng sử dụng kỹ thuật Luminex. ***: chỉ $p < 0,001$; ****: chỉ $p < 0,0001$.

Mức độ biểu hiện khác nhau của 6 yếu tố tăng trưởng được phân tích, tuy nhiên chúng không biểu hiện khác nhau giữa các nhóm bệnh. Chỉ có một yếu tố là GDF-15 biểu hiện khác biệt giữa các nhóm bệnh.

4. Bàn luận

Cytokine là nhóm polypeptide đa dạng, gồm có các interleukin, chemokine, các yếu tố hoại tử khối u, interferon, các yếu tố kích thích tế bào và tăng trưởng, và cả neurotrophin cũng đã được phân loại vào nhóm này. Cytokine có chức năng đa dạng đối với sự phát triển và biệt hóa tế bào, phản ứng miễn dịch, viêm nhiễm và trên một số hệ thống sinh lý/bệnh lý khác nhau. Các nghiên cứu trước đây cho rằng, nhiều cytokine đáp ứng biểu hiện với các tình trạng bệnh lý khác nhau. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã đánh giá và phát hiện sự biểu hiện của 22 cytokine và yếu tố tăng trưởng trong DNT của bệnh nhân RLCT, VTCN và liệt. Trong số đó, có 1 yếu tố kháng viêm APRIL biểu hiện rất cao với trên 9.000 pg/ml, 4 yếu tố biểu hiện lớn hơn 100 pg/ml (gồm có một yếu tố gây viêm GM-CSF, một yếu tố kháng viêm ST2 (IL-33R) và 2 yếu tố tăng trưởng là M-CSF và GDF-15). Các yếu tố biểu hiện thấp với hàm lượng nhỏ hơn 10 pg/ml gồm có IFN- γ và IL-1 β thuộc nhóm gây viêm, BAF và IL-10 thuộc nhóm kháng viêm và EGF thuộc nhóm yếu tố tăng trưởng. Cho tới nay, chỉ có một số báo cáo về mức độ cytokine trong DNT của bệnh nhân mắc đa xơ cứng, giang mai thần kinh, viêm màng não, tự kỷ... [17-20]. Tuy nhiên, có rất ít báo cáo về các thành phần này trong DNT của bệnh nhân RLCT, VTCN và liệt. Trong một nghiên cứu trước đây về 3 bệnh nhân RLCT, hàm lượng cytokine viêm IL-4 trong huyết thanh bệnh nhân là 40-69 pg/ml [21]. Đặc biệt là hàm lượng IL-4 giảm đáng kể, thậm chí xuống mức không thể phát hiện được sau 2 tháng áp dụng biện pháp điều trị [21]. Ở một nghiên cứu khác về mức độ biểu hiện của IL-6 và IL-17 trong DNT của bệnh nhân VTCN, cả hai yếu tố này đều biểu hiện cao hơn so với nhóm đối chứng khỏe mạnh, bệnh nhân đa xơ cứng và bệnh thần kinh khác [22]. Cụ thể, IL-6 biểu hiện ở mức 12536 ± 2657 pg/ml, cao gấp 4,7 lần so với nhóm đối chứng khỏe mạnh và IL-17 biểu hiện ở mức $302,6 \pm 152,5$ pg/ml, cao gấp 8,4 lần so với nhóm đối chứng khỏe mạnh [22]. IL-6 cũng cho thấy biểu hiện cao hơn hẳn trong các bệnh nhân màng não cầu do vi khuẩn và virus so với người khỏe mạnh không mang các bệnh lý viêm thần kinh [17]. Với bệnh liệt, nghiên cứu của S. Basu và cs (2004) [23] cho thấy, hàm lượng IL-1 β , IL-6, IL-12, IFN- γ và TNF- α cao hơn trong tinh dịch của nam giới bị liệt so với nam giới khỏe mạnh, trong khi đó hàm lượng IL-4 và TGF- β 1 lại thấp hơn trong tinh dịch của nam giới bị liệt so với người khỏe mạnh. Do các nghiên cứu sử dụng các loại mẫu khác nhau (ví dụ như huyết thanh, tinh dịch hay DNT) để phân tích cytokine nên rất khó để so sánh mức độ biểu hiện của các cytokine giữa các nghiên cứu khác nhau. Ngoài các báo cáo trên, không có báo cáo nào về mối liên hệ của các thành phần cytokine và yếu tố tăng trưởng trong nghiên cứu này của chúng tôi với các bệnh lý RLCT, VTCN và liệt do tổn thương thần kinh gây nên.

Trong mối tương quan về mức độ biểu hiện cytokine với các loại bệnh lý, một số yếu tố có xu hướng biểu hiện cao hơn trong DNT của bệnh nhân liệt, cụ thể là 6 yếu tố IL-17A, IL-6, TNF- α ,

IL-5, APRIL và GDF-15 (hình 1-3). Tuy nhiên, cho tới nay chưa thấy có báo cáo nào về các yếu tố này trong DNT hay huyết thanh của người bị liệt, ngoại trừ TNF- α đã được báo cáo biểu hiện cao ở tinh dịch của bệnh nhân liệt. Do vậy, cần phải có nghiên cứu sâu hơn về mức độ biểu hiện của các yếu tố này với bệnh liệt do viêm thần kinh gây ra.

Nghiên cứu của chúng tôi là nghiên cứu đầu tiên ở Việt Nam và nghiên cứu tiên phong trên thế giới về mức độ biểu hiện cytokine và yếu tố tăng trưởng trong DNT của bệnh nhân RLCT, VTCN và liệt. Tuy nhiên, nghiên cứu này có điểm hạn chế là cỡ mẫu còn nhỏ do số lượng bệnh nhân sử dụng liệu pháp ghép tế bào gốc không nhiều. Do vậy, cần phải tiến hành nghiên cứu trên cỡ mẫu lớn hơn để đánh giá và so sánh mức độ biểu hiện của cytokine và các yếu tố tăng trưởng trong DNT của các bệnh nhân RLCT, VTCN. Đồng thời có thể đánh giá được mối liên quan của cytokine với các loại bệnh lý khác nhau.

5. Kết luận

Nghiên cứu này đã phát hiện sự có mặt của 22 yếu tố gồm có cytokine gây viêm, cytokine chống viêm và yếu tố tăng trưởng trong DNT của bệnh nhân RLCT, VTCN và liệt. Sự biểu hiện của các yếu tố là khác nhau, tuy nhiên chỉ có IL-17A, IL-6, TNF- α , GDF-15, APRIL, IL-6 và IL-21 là có biểu hiện cao hơn ở bệnh nhân ở một nhóm bệnh này so với nhóm bệnh khác. Chúng tôi nhận thấy rằng, đây là các dữ liệu thăm dò mới, có ý nghĩa quan trọng trong lĩnh vực nghiên cứu thành phần và mức độ biểu hiện protein trong DNT của bệnh nhân RLCT, VTCN và liệt. Đồng thời, đây là tiền đề để xây dựng và phát triển các nghiên cứu chất chỉ thị bệnh. Tuy nhiên, đây là nghiên cứu thăm dò thực hiện trên cỡ mẫu nhỏ, cần phải triển khai nghiên cứu trên cỡ mẫu lớn hơn để có thể phát triển thành chất chỉ thị phát hiện bệnh.

LỜI CẢM ƠN

Chúng tôi xin gửi lời cảm ơn đến bác sỹ Nguyễn Thị Phương Anh - Khoa Y học Tái tạo và Trị liệu Tế bào, Công ty Cổ phần Bệnh viện Đa khoa Quốc tế Vinmec đã thu thập dịch não tủy từ bệnh nhân giúp nhóm nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] A.E.S. Hassan, Y.L. Du, S.Y. Lee, et al. (2022), "Spina bifida: A review of the genetics, pathophysiology and emerging cellular therapies", *Journal of Developmental Biology*, **10**(2), DOI: 10.3390/jdb10020022.
- [2] P.T. Dorsher, P.M. McIntosh (2012), "Neurogenic bladder", *Advances in Urology*, **2012**, DOI: 10.1155/2012/816274.
- [3] G. Amarenco, S.S. Ismaël, C. Chesnel, et al. (2017), "Diagnosis and clinical evaluation of neurogenic bladder", *European Journal of Physical and Rehabilitation Medicine*, **53**(6), pp.975-980, DOI: 10.23736/S1973-9087.17.04992-9.
- [4] P.J. Austin, G.M. Taylor (2010), "The neuro-immune balance in neuropathic pain: Involvement of inflammatory immune cells, immune-like glial cells and cytokines", *Journal of Neuroimmunology*, **229**(1-2), pp.26-50, DOI: 10.1016/j.jneuroim.2010.08.013.

- [5] A. Ponticelli, B.D. Iacobelli, M. Silveri, et al. (1998), "Colorectal dysfunction and faecal incontinence in children with spina bifida", *British Journal of Urology*, **81**, Suppl. 3, pp.117-119, DOI: 10.1046/j.1464-410x.1998.00026.x.
- [6] A.I. Kaplin, C. Krishnan, D.M. Deshpande, et al. (2005), "Diagnosis and management of acute myelopathies", *The Neurologist*, **11**(1), pp.2-18, DOI: 10.1097/01.nrl.0000149975.39201.0b.
- [7] C.G. Simone, P.D. Emmady (2022), "Transverse myelitis", *StatPearls [Internet]*, StatPearls Publishing, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559302/>, accessed 20 February 2023.
- [8] D.M. Wingerchuk (2003), "Postinfectious encephalomyelitis", *Current Neurology and Neuroscience Reports*, **3**, pp.256-264, DOI: 10.1007/s11910-003-0086-x.
- [9] A. Bhat, S. Naguwa, G. Cheema, et al. (2010), "The epidemiology of transverse myelitis", *Autoimmunity Reviews*, **9**(5), pp.A395-A399, DOI: 10.1016/j.autrev.2009.12.007.
- [10] J.A. Goodfellow, H.J. Willison (2016), "Guillain-Barré syndrome: A century of progress", *Nature Reviews Neurology*, **12**, pp.723-731, DOI: 10.1038/nrneurol.2016.172.
- [11] Christopher and Dana Reeve Foundation (2013), "Paralysis in the U.S.", <https://www.christopherreeve.org/living-with-paralysis/statsabout-paralysis>, accessed 20 February 2023.
- [12] M.A. Thacker, A.K. Clark, F. Marchand, et al. (2007), "Pathophysiology of peripheral neuropathic pain: Immune cells and molecules", *Anesthesia & Analgesia*, **105**(3), pp.838-847, DOI: 10.1213/01.ane.0000275190.42912.37.
- [13] A. Uzawa, M. Mori, K. Arai, et al. (2010), "Cytokine and chemokine profiles in neuromyelitis optica: Significance of interleukin-6", *Multiple Sclerosis Journal*, **16**(12), pp.1443-1452, DOI: 10.1177/1352458510379247.
- [14] A. Wullschleger, V. Kapina, N. Molnarfi, et al. (2013), "Cerebrospinal fluid interleukin-6 in central nervous system inflammatory diseases", *PLOS ONE*, **8**(8), DOI: 10.1371/journal.pone.0072399.
- [15] A.I. Kaplin, D.M. Deshpande, E. Scott, et al. (2005), "IL-6 induces regionally selective spinal cord injury in patients with the neuroinflammatory disorder transverse myelitis", *The Journal of Clinical Investigation*, **115**(10), pp.2731-2741, DOI: 10.1172/JCI25141.
- [16] B. Mukhopadhyay, R. Gavel, A.N. Gongopadhyay, et al. (2016), "Correlation of oxidative damage with pro-inflammatory markers (IL-6, TNF- α) in meningocele", *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, **10**(2), pp.BC08-BC10, DOI: 10.7860/JCDR/2016/15872.7229.
- [17] G. Lepennetier, Z. Hracsko, M. Unger, et al. (2019), "Cytokine and immune cell profiling in the cerebrospinal fluid of patients with neuro-inflammatory diseases", *Journal of Neuroinflammation*, **16**, DOI: 10.1186/s12974-019-1601-6.
- [18] A.W. Zimmerman, H. Jyonouchi, A.M. Comi, et al. (2005), "Cerebrospinal fluid and serum markers of inflammation in autism", *Pediatr Neurol*, **33**(3), pp.195-201, DOI: 10.1016/j.pediatrneurol.2005.03.014.
- [19] S.Z. Lepej, T.V. Cavlek, M. Ilic, et al. (2022), "Quantification of antiviral cytokines in serum, cerebrospinal fluid and urine of patients with tick-borne encephalitis in Croatia", *Vaccines*, **10**(11), DOI: 10.3390/vaccines10111825.
- [20] S.D. Lolansen, N. Rostgaard, E.K. Oernbo, et al. (2021), "Inflammatory markers in cerebrospinal fluid from patients with hydrocephalus: A systematic literature review", *Disease Markers*, **2021**, DOI: 10.1155/2021/8834822.
- [21] N.S. Kumar, V. Chavarria, M. Frieri (1995), "Cytokine detection in three children with spina bifida and health care workers with latex allergy", *Pediatric Asthma, Allergy & Immunology*, **9**(2), pp.71-78, DOI: 10.1089/pai.1995.9.71.
- [22] J.J. Graber, S.R. Allie, K.M. Mullen, et al. (2018), "Interleukin-17 in transverse myelitis and multiple sclerosis", *Journal of Neuroimmunology*, **196**(1-2), pp.124-132, DOI: 10.1016/j.jneuroim.2008.02.008.
- [23] S. Basu, T.C. Aballa, S.M. Ferrell, et al. (2004), "Inflammatory cytokine concentrations are elevated in seminal plasma of men with spinal cord injuries", *Journal of Andrology*, **25**(2), pp.250-254, DOI: 10.1002/j.1939-4640.2004.tb02785.x.

Hiệu quả nuôi ăn qua sonde bằng súp nhỏ giọt cho người bệnh tại Bệnh viện Hữu nghị Đa khoa Nghệ An

Nguyễn Đức Phúc*, Nguyễn Quỳnh Anh

Bệnh viện Hữu nghị Đa khoa Nghệ An, km 5, đại lộ Lê Nin, xã Nghi Phú, TP Vinh, tỉnh Nghệ An, Việt Nam

Ngày nhận bài 5/6/2023; ngày chuyển phản biện 8/6/2023; ngày nhận phản biện 30/6/2023; ngày chấp nhận đăng 3/7/2023

Tóm tắt:

Nuôi ăn qua sonde nhằm duy trì dinh dưỡng đường tiêu hóa, bảo vệ chức năng sinh lý hệ tiêu hóa, cung cấp dinh dưỡng sớm cho người bệnh nặng. Đây là biện pháp hiệu quả được khuyến nghị áp dụng trong vòng 48 giờ sau nhập viện. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá hiệu quả nuôi ăn qua sonde bằng súp nhỏ giọt cho người bệnh tại Bệnh viện Hữu nghị Đa khoa Nghệ An. Nghiên cứu sử dụng phương pháp tiền cứu và mô tả trên 255 người bệnh từ tháng 4/2022 đến tháng 6/2022 tại các Khoa: Hồi sức Tích cực, Hồi sức Tích cực Ngoại khoa, Chống độc, Nhiễm khuẩn Tổng hợp, Bỏng, Ngoại tiêu hóa và Trung tâm Đột quỵ. Kết quả nghiên cứu cho thấy, năng lượng được cung cấp ngày đầu là 1.015,2 kcal, ngày thứ 7 là 1.409 kcal, tỷ lệ suy dinh dưỡng theo chỉ số MUAC (chu vi vòng cánh tay) tăng từ 6,7 lên 8,2%, chỉ số albumin huyết thanh giảm từ 78,6 xuống 76,2%, chỉ số SGA (công cụ đánh giá tổng thể chủ quan) tăng từ 54,9 lên 77,6%, năng lượng cung cấp tương đối đầy đủ và tình trạng suy dinh dưỡng được cải thiện.

Từ khóa: người bệnh nặng, nuôi ăn qua sonde, suy dinh dưỡng.

Chỉ số phân loại: 3.2

1. Đặt vấn đề

Nuôi ăn qua sonde giúp làm giảm nguy cơ nhiễm trùng, sử dụng chức năng ruột một cách bình thường, tránh teo nhung mao, giảm khả năng mất cân bằng điện giải, an toàn, sinh lý và tiết kiệm kinh tế [1, 2]. Việc sử dụng súp tự chế biến ở mỗi quốc gia là khác nhau và chưa có nhiều nghiên cứu trên thế giới. Ở Việt Nam, Bệnh viện Bạch Mai và Bệnh viện Chợ Rẫy nghiên cứu cho thấy, súp tự chế biến có hiệu quả hơn so với người nhà tự chế biến [3]. Nhằm nâng cao hiệu quả dinh dưỡng cho bệnh nhân nuôi dưỡng bằng súp nhỏ giọt qua sonde, các tác giả thực hiện nghiên cứu này với mục tiêu: “Đánh giá kết quả nuôi ăn qua sonde bằng súp nhỏ giọt cho người bệnh tại Bệnh viện Hữu nghị Đa khoa Nghệ An từ tháng 4/2022 đến tháng 6/2022”.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

Người bệnh được chỉ định nuôi ăn qua sonde bằng súp nhỏ giọt tại Bệnh viện Hữu nghị Đa khoa Nghệ An từ tháng 4/2022 đến tháng 6/2022, gồm những người bệnh hôn mê, phẫu thuật đường tiêu hóa, bỏng nặng, hẹp thực quản, người bệnh suy dinh dưỡng nặng... tại các Khoa: Hồi sức Tích cực, Hồi sức Tích cực Ngoại khoa, Chống độc, Nhiễm khuẩn Tổng hợp, Bỏng, Ngoại Tiêu hóa và Trung tâm Đột quỵ.

Tiêu chuẩn chọn người bệnh: Người bệnh được chỉ định nuôi ăn qua sonde bằng súp nhỏ giọt >7 ngày, chức năng đường tiêu hóa hoạt động bình thường, hồ sơ bệnh án đầy đủ thông tin.

Tiêu chuẩn loại trừ: Người bệnh hoặc người nhà người bệnh không đồng ý tham gia nghiên cứu.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Thiết kế nghiên cứu: mô tả, tiền cứu.

Cỡ mẫu: 255 người bệnh được chỉ định nuôi ăn qua sonde bằng súp nhỏ giọt >7 ngày, chọn mẫu thuận tiện.

Biến số nghiên cứu bao gồm:

- Đặc điểm chung: tuổi, giới tính, ngày vào viện, ngày ra viện, số ngày nằm viện, địa chỉ, chẩn đoán.

- Lâm sàng: MUAC: bình thường: ≥ 23 cm đối với nữ, ≥ 24 cm đối với nam; suy dinh dưỡng: < 23 cm đối với nữ, < 24 cm đối với nam.

+ Công cụ SGA (đánh giá tình trạng dinh dưỡng tổng thể dựa vào 2 phần chính là đặc điểm bệnh sử và khám lâm sàng, phân loại A: bình thường, B: suy dinh dưỡng vừa hoặc nhẹ, C: suy dinh dưỡng nặng).

+ Các dấu hiệu dung nạp đường tiêu hóa: trào ngược, chướng bụng, dịch tồn dư, tiêu chảy sau khi ăn súp.

- Cận lâm sàng: Các kết quả xét nghiệm được thực hiện vào 2 thời điểm: ngày đầu tiên và ngày thứ 7 nuôi ăn qua sonde.

Sinh hóa máu (albumin huyết thanh là một chỉ tiêu thường được sử dụng để đánh giá dự trữ protein nội tạng, giúp theo dõi tình trạng dinh dưỡng cho bệnh nhân, phân loại albumin ≥ 35 g/l: bình thường, < 35 g/l: suy dinh dưỡng).

Kết quả nuôi ăn bằng súp nhỏ giọt qua sonde: dung nạp đường tiêu hóa, tỷ lệ nuôi ăn theo đường tiêu hóa và tĩnh mạch, tình trạng dinh dưỡng của người bệnh.

*Tác giả liên hệ: Email: nguyenducphuckhoacc@gmail.com

Effectiveness of enteral tube feeding by gravity drip soup for patients at Nghe An General Friendship Hospital

Duc Phuc Nguyen*, Quynh Anh Nguyen

Nghe An General Friendship Hospital, km 5, Lenin Avenue,
Nghị Phú Commune, Vinh City, Nghe An Province, Vietnam

Received 5 June 2023; revised 30 June 2023; accepted 3 July 2023

Abstract:

Enteral nutrition via feeding tube aims to maintain nutrition by the gastrointestinal tract, protect the physiological function of the digestive system and provide early enteral nutrition for critically ill patients. Enteral tube feeding is an efficient method recommended to start within 48 hours after admission. This study aims to evaluate the effectiveness of enteral tube feeding by gravity drip soup for patients in Nghe An General Friendship Hospital. The descriptive and prospective studies were conducted on 255 patients, from April 2022 to June 2022 at the Intensive Care, Surgical Intensive Care, Poison Control, General Infections, Gastrointestinal Surgery, Burns Departments, and Stroke Centre. The results showed that the total energy intake provided on the 1st and 7th days was 1,015.2 kcal and 1,409 kcal, respectively. The malnutrition rate assessed by the mid-upper arm circumference (MUAC) index increased from 6.7 to 8.2%; serum albumin index decreased from 78.6 to 76.2%; by the subjective global assessment (SGA) index increased from 54.9 to 77.6%; the energy supply is relatively adequate and malnutrition is improved.

Keywords: critically ill patients, enteral tube feeding, malnutrition.

Classification number: 3.2

Các công cụ nghiên cứu: MUAC, SGA, bảng phân loại suy dinh dưỡng theo albumin huyết thanh. Đo MUAC được thực hành như sau: yêu cầu bệnh nhân đứng thẳng với khuỷu tay và thả lỏng, tay phải buông thõng xuống; tiến hành xác định điểm giữa cánh tay là trung tâm của đoạn từ móm cùng vai đến móm trên lồi cầu ngoài xương cánh tay rồi dùng bút đánh dấu ở mặt sau của cánh tay. Đặt thước dây quanh cánh tay tại điểm giữa đã được đánh dấu, kéo thước vòng quanh cánh tay một cách vừa khít sao cho mặt cánh tay tiếp xúc với thước đo. Chỉ nhận số đo thu được đến giá trị 0,1 cm.

SGA là công cụ đánh giá tình trạng dinh dưỡng tổng thể dựa vào 2 phần chính là đặc điểm bệnh sử và khám lâm sàng. Phần bệnh sử gồm các đặc điểm: thay đổi cân nặng, thói quen ăn uống, triệu chứng đường tiêu hóa, khả năng sinh hoạt, thay đổi khả năng sinh hoạt trong bao nhiêu tuần, bệnh lý và nhu cầu dinh dưỡng liên quan, nhu cầu chuyển hóa (stress). Phần khám lâm sàng: dựa vào

đánh giá chủ quan trên lâm sàng (mất mỡ dưới da (cơ tam đầu, ngực), teo cơ (cơ delta, cơ tứ đầu), phù...).

Albumin huyết thanh là một chỉ tiêu thường được sử dụng để đánh giá dự trữ protein nội tạng, giúp theo dõi tình trạng dinh dưỡng cho bệnh nhân. Albumin có ý nghĩa lớn trong đánh giá các trường hợp thiếu dinh dưỡng mạn tính. Albumin <35 g/l được coi là giảm. Sự suy giảm nồng độ albumin huyết thanh có liên quan đến sự gia tăng tỷ lệ bệnh tật và tử vong ở những bệnh nhân điều trị tại bệnh viện. Vì vậy, mức độ albumin còn được sử dụng như là chỉ số tiên lượng.

Đánh giá đáp ứng so với nhu cầu khuyến nghị: Tính toán khẩu phần thực tế người bệnh thu được thực tế so sánh với nhu cầu dinh dưỡng khuyến nghị cho người Việt Nam năm 2016 của Bộ Y tế. Công thức tính mức đáp ứng: MDU = Năng lượng khẩu phần thực tế tính được/Nhu cầu năng lượng khuyến nghị x 100.

Các dấu hiệu không dung nạp thức ăn: trào ngược, chướng bụng - đầy hơi, có dịch tồn lưu, tiêu chảy sau ăn.

3. Kết quả

Bảng 1. Đặc điểm về tuổi, giới tính, nguyên nhân nuôi ăn qua sonde.

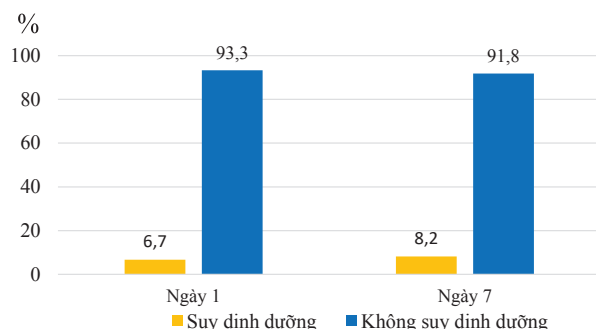
Đặc điểm	Giới tính	Số người bệnh (n=255)	Tỷ lệ (%)
Giới tính	Nam	182	71,4
	Nữ	73	28,6
Tuổi ($\bar{x} \pm SD$) 61,7 $\pm$ 17,7 (22-89)	20-39	29	11,4
	40-59	75	29,4
	>60	151	59,2
Nguyên nhân	Hôn mê	180	70,6
	Phẫu thuật đường tiêu hóa	20	7,8
	Bong nặng	1	0,4
	Hẹp thực quản	2	0,8
	Suy dinh dưỡng nặng	23	9,0
	Các nguyên nhân khác	29	11,4
	Tổng	255	100

Kết quả bảng 1 cho thấy, độ tuổi ≥ 60 chiếm tỷ lệ cao nhất, tuổi trung bình của nhóm nghiên cứu là 61,7 $\pm$ 17,7, thấp nhất là 22 tuổi, cao nhất là 89 tuổi. Tỷ lệ nam (71,4%) cao hơn nữ (28,6%). Nguyên nhân nuôi ăn qua sonde chủ yếu là hôn mê (70,6%), tiếp đến là suy dinh dưỡng nặng (9,0%), phẫu thuật đường tiêu hóa (7,8%).

Bảng 2. Thay đổi nồng độ albumin và tỷ lệ suy dinh dưỡng theo chỉ số MUAC sau 7 ngày nuôi ăn qua sonde (n=255).

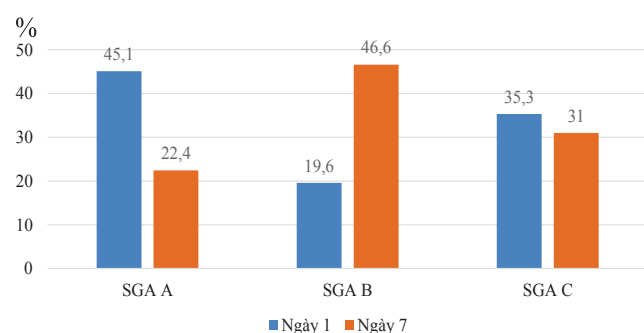
Chỉ số cận lâm sàng	Ngày 1	Ngày 7
Albumin (g/l)	30,5 $\pm$ 4,70	31,2 $\pm$ 5,7
MUAC (cm)	27,6 $\pm$ 2,3	26,7 $\pm$ 2,1

Kết quả bảng 2 cho thấy, chỉ số albumin huyết thanh trung bình ngày thứ 7 tăng so với ngày thứ nhất là 0,7 g/l; chu vi vòng cánh tay trung bình ngày thứ 7 giảm so với ngày thứ nhất là 0,9 cm.



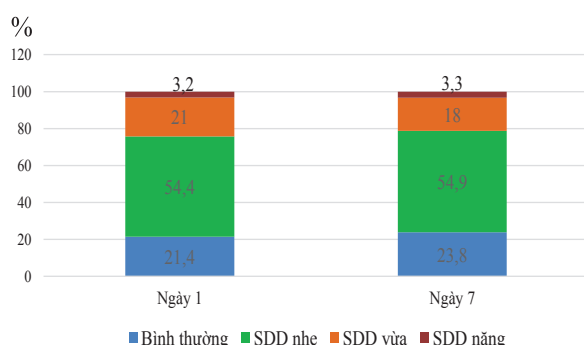
Biểu đồ 1. Thay đổi tỷ lệ suy dinh dưỡng theo chỉ số MUAC sau 7 ngày nuôi ăn qua sonde (n=255).

Tỷ lệ suy dinh dưỡng theo chu vi vòng cánh tay (6,7%) tăng lên 8,2% ở ngày thứ 7 (biểu đồ 1).



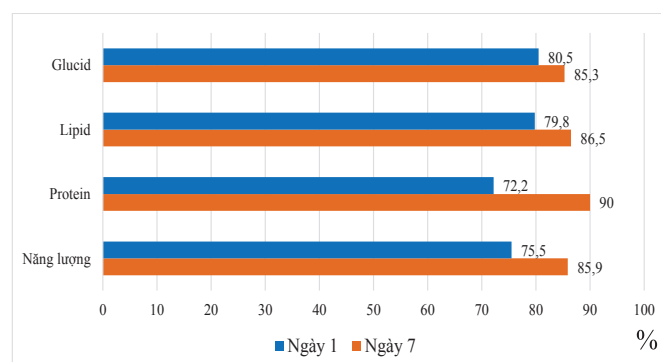
Biểu đồ 2. Thay đổi công cụ đánh giá tổng thể chủ quan SGA sau 7 ngày nuôi ăn qua sonde (n=255).

Tỷ lệ suy dinh dưỡng theo SGA sau 7 ngày tăng từ 54,9 lên 77,6%; mức độ vừa và nhẹ (SGA B) tăng từ 19,6 lên 46,6%, mức độ nặng (SGA C) giảm từ 35,3 xuống 31% (biểu đồ 2).



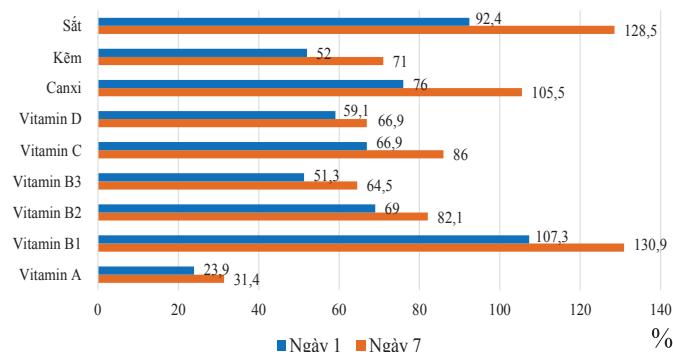
Biểu đồ 3. Thay đổi nồng độ albumin huyết thanh sau 7 ngày nuôi ăn qua sonde (n=255).

Từ biểu đồ 3 ta thấy, tỷ lệ suy dinh dưỡng theo chỉ số albumin huyết thanh ngày 1 là 78,6% và ngày 7 là 76,2%, với mức độ nặng 3,3%, vừa 18%, nhẹ 54,9%.



Biểu đồ 4. Sự thay đổi tỷ lệ cung cấp các chất sinh năng lượng so với nhu cầu khuyến nghị (n=255).

Biểu đồ 4 cho thấy, ngày 1 năng lượng đạt 75,5%, lipid đạt 79,8%, protein 72,2%, glucid 80,5% so với nhu cầu khuyến nghị. Ngày 7 năng lượng đạt 85,9%, protein 90%, glucid 85,3%, lipid 86,5% so với nhu cầu khuyến nghị.



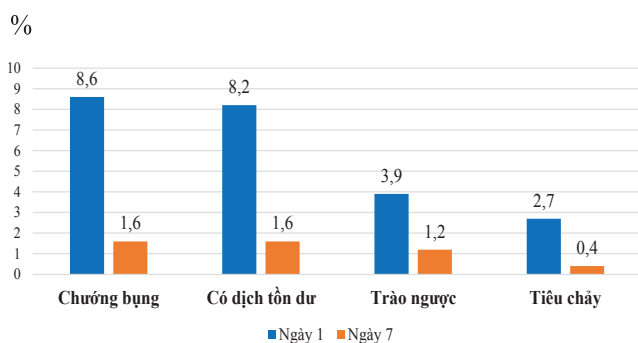
Biểu đồ 5. Sự thay đổi tỷ lệ cung cấp các vitamin và muối khoáng so với nhu cầu khuyến nghị (n=255).

Biểu đồ 5 cho thấy, ở ngày 1, vitamin A chỉ đạt 23,9%, vitamin B1 đạt 107,3%, vitamin B2 đạt 69%, vitamin B3 đạt 51,3%, vitamin C đạt 66,9%, vitamin D đạt 59,1%, canxi đạt 76%, kẽm đạt 52% và sắt đạt 92,4% so với nhu cầu khuyến nghị. Tại ngày 7, vitamin A đạt 31,4%, vitamin B1 đạt 130,9%, vitamin B2 đạt 82,1%, vitamin B3 đạt 64,5%, vitamin C đạt 86%, vitamin D đạt 66,9%, canxi đạt 105,5%, kẽm đạt 71% và sắt đạt 128,5% so với nhu cầu khuyến nghị.

Bảng 3. Chi phí nuôi ăn qua sonde ngày 1 và 7.

Chi phí dinh dưỡng	Ngày 1	Ngày 7
Chi phí dịch nuôi dưỡng tĩnh mạch (nghìn đồng)	227,1±288,4	25,5±119,3
Chi phí súp ăn qua sonde (nghìn đồng)	146,0±30,6	179,3±16,1
Tổng chi phí dinh dưỡng (nghìn đồng)	373,1±277,7	204,8±123,4

Kết quả bảng 3 cho thấy, chi phí nuôi ăn ngày thứ nhất là 373.100 đồng, 227.100 đồng cung cấp 20,2% năng lượng qua đường tĩnh mạch; 146.000 đồng cung cấp 79,8% năng lượng qua sonde. Chi phí nuôi ăn ngày thứ 7 là 204.800 đồng; 25.500 đồng cung cấp 2,7% năng lượng đường tĩnh mạch; 179.300 đồng cung cấp 97,3% năng lượng qua sonde.



Biểu đồ 6. Các triệu chứng tiêu hóa của của đối tượng nghiên cứu (n=255).

Biểu đồ 6 cho thấy, dấu hiệu đường tiêu hóa ngày thứ 1 và ngày thứ 7: chướng bụng giảm từ 8,6 xuống 1,6%, có dịch tồn dư giảm từ 8,2 xuống 1,6%, trào ngược giảm từ 3,9 xuống 1,2% và tiêu chảy giảm từ 2,7 xuống còn 0,4%.

4. Bàn luận

Tuổi trung bình của nhóm nghiên cứu là $61,7 \pm 17,7$, thấp nhất là 22, cao nhất là 89 tuổi, tuổi ≥ 60 chiếm 59,2%, tương tự với kết quả nghiên cứu của T.T. Nguyen và cs (2018) [4], tuổi trung bình là $66,7 \pm 15,3$, tuổi > 60 chiếm 61,9%. Tuổi cao, nguy cơ dinh dưỡng cao hơn có liên quan đến tỷ lệ tử vong cao hơn [5]. Tỷ lệ nam/nữ là 2,5/1; chủ yếu người bệnh ăn qua sonde tại Khoa Hồi sức (89,1%), nguyên nhân nuôi ăn qua sonde chủ yếu là hôn mê (70,6%).

4.1. Thay đổi tình trạng dinh dưỡng của người bệnh

Chỉ số albumin huyết thanh trung bình ở ngày 7 tăng so với ngày thứ nhất là 0,7 g/l; chu vi vòng cánh tay trung bình ngày 7 giảm so với ngày thứ nhất là 0,9 cm. H. Kim và cs (2011) [6] nghiên cứu trên 48 người bệnh điều trị tích cực ăn qua sonde sau 7 ngày cho thấy, tình trạng dinh dưỡng xấu đi ở những người bệnh suy dinh dưỡng nặng hơn so với những người bệnh có nghi ngờ về nguy cơ dinh dưỡng. Các chỉ số MUAC, bề dày lớp mỡ dưới da, chỉ số khối cơ thể, chu vi cơ giữa cánh tay và các chỉ số albumin, prealbumin, transferrin sau 7 ngày đều giảm so với ngày thứ nhất [6]. Trong nghiên cứu này, tỷ lệ suy dinh dưỡng đánh giá bằng chu vi vòng cánh tay tăng từ 6,7 ở ngày thứ 1 lên 8,2% ở ngày thứ 7, có thể do đây là giai đoạn đầu stress của bệnh, cơ bắp giảm vận động nên có sự giảm nhanh chu vi vòng cánh tay; đánh giá bằng albumin huyết thanh giảm 3%, từ 78,6 ở ngày thứ 1, xuống còn 76,2% ở ngày thứ 7; chỉ số SGA sau 7 ngày nuôi ăn tăng 23,3%, từ 54,9 lên 77,6%; trong đó: mức độ vừa và nhẹ tăng từ 19,6 lên 46,6%; mức độ nặng giảm từ 35,3 xuống 31%.

Về dinh dưỡng, ngày nuôi ăn thứ 1 mức năng lượng đạt 75,5%, ngày thứ 7 đạt 85,9% nhu cầu khuyến nghị. Nguyên nhân suy dinh dưỡng tăng có thể do mức nuôi dưỡng chưa đạt. Tuy nhiên, đối với người bệnh nằm Khoa Hồi sức Tích cực thì tỷ lệ tăng suy dinh dưỡng sau một tuần khá phổ biến và tình trạng dinh dưỡng không chỉ phụ thuộc vào chế độ dinh dưỡng mà còn có các yếu tố khác tác

động trực tiếp như: tình trạng bệnh, khả năng vận động, khả năng hấp thu của người bệnh, tăng dị hóa, tăng nhiễm khuẩn...

4.2. Về các vitamin và khoáng chất so với nhu cầu khuyến nghị của Bộ Y tế năm 2016 cho người Việt Nam

Đối với những người bệnh nặng được khuyến cáo bổ sung vitamin B1 hằng ngày với liều 200 mg chia 2 lần tiêm tĩnh mạch [7], người bệnh suy dinh dưỡng có nguy cơ thiếu hụt vitamin B1 [8]. Bảng chứng cho thấy, người bệnh nặng, thiếu vitamin D nặng được điều trị bằng vitamin D liều cao sớm có thể cải thiện tỷ lệ tử vong [9]. Sau 7 ngày nuôi ăn qua sonde, hàm lượng vitamin A đạt 31,4%, vitamin B1 đạt 130,9%, vitamin B2 đạt 82,1%, vitamin B3 đạt 64,5%, vitamin C đạt 86%, vitamin D đạt 66,9%, canxi đạt 105,5%, kẽm đạt 71% và sắt đạt 128,5% so với nhu cầu khuyến nghị.

4.3. Về chi phí nuôi ăn

Nuôi dưỡng tĩnh mạch dài ngày làm tăng chi phí, túi dinh dưỡng kết hợp 3 thành phần trung bình có giá 680.000/1000 ml/700 kcal. Trong khi nuôi ăn đường tiêu hóa với súp nhỏ giọt giá 172.000/1000 ml/1500 kcal, xấp xỉ 1/8 lần đường tĩnh mạch. Trong khi súp nhỏ giọt qua sonde có thêm các thành phần như: chất xơ, vitamin và khoáng chất từ lượng lớn sữa và rau củ quả, còn túi kết hợp 3 ngăn dài ngày cần phải bổ sung thêm vitamin dạng viên hoặc tiêm truyền (giá có thể đến 120.000 đồng/ngày); cũng cần bổ sung thêm đa số các chất khoáng như: natri, kali, magie, canxi, sắt, kẽm... để đáp ứng các nhu cầu hằng ngày của cơ thể. Tỷ lệ cung cấp năng lượng nuôi ăn từ đường tĩnh mạch ngày thứ 1 và ngày thứ 7 giảm từ 16,86 xuống 2,4%, nghĩa là giảm 14,6% năng lượng cung cấp từ nuôi ăn tĩnh mạch, tiết kiệm chi phí 169.000 đồng/ngày. Như vậy, chi phí nuôi ăn tĩnh mạch (chưa bao gồm vitamin và chất khoáng) cần trên 1.000.000 đồng/ngày thì mới cung cấp năng lượng tương đương nuôi dưỡng đường tiêu hóa 172.000 đồng. Nếu so sánh túi dinh dưỡng qua sonde của các nhà sản xuất cung cấp 750 kcal và các thành phần protein, lipid, glucid cũng tương tự HP08, có giá dao động 250.000-280.000 đồng, cao gấp 3,2 lần so với súp chế biến của bệnh viện, với thời gian nằm viện trung bình 15,6 ngày tiết kiệm được cho người bệnh 5.830.000 đồng.

4.4. Thay đổi về dấu hiệu tiêu hóa

Sau 7 ngày nuôi ăn qua sonde, tỷ lệ chướng bụng giảm từ 8,6 xuống 1,6%, dịch tồn dư giảm từ 8,2 xuống 1,6%, trào ngược từ 3,9 xuống 1,2% và tiêu chảy từ 2,7 xuống 0,4%. Nghiên cứu của T.T. Nguyen và cs (2018) [4] cho thấy, trào ngược dạ dày là yếu tố hàng đầu liên quan đến suy dinh dưỡng, có hoặc không kèm tiêu chảy. Trong khi đó, G. Elke và cs (2016) [10] lại cho rằng, thể tích tồn dư dịch dạ dày được coi là một thông số đại diện cho rối loạn chức năng đường tiêu hóa, trong giai đoạn đầu của người bệnh nặng. Tuy vậy, một điểm chung được nhiều nghiên cứu công nhận

đó là lợi ích của dinh dưỡng qua đường tiêu hóa đã giúp người bệnh nhanh chóng hồi phục, đồng thời giảm thời gian và chi phí điều trị.

5. Kết luận

Thành phần các chất dinh dưỡng của súp nhỏ giọt đạt tỷ lệ khá cao so với nhu cầu khuyến nghị, năng lượng qua sonde ngày thứ 1 là 1.015,2 kcal và ngày thứ 7 là 1.409 kcal, các dấu hiệu đường tiêu hóa đã giảm đáng kể ở ngày thứ 7. Tỷ lệ suy dinh dưỡng sau 7 ngày đánh giá bằng MUAC tăng từ 6,7 lên 8,2%; đánh giá bằng albumin giảm từ 78,6 xuống 76,2%; đánh giá bằng công cụ SGA tăng từ 54,9 lên 77,6%; nuôi ăn qua sonde đã giúp tiết kiệm đáng kể chi phí về dinh dưỡng cho người bệnh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] V.H. Nguyen, V.Q. Le, L.H. Trinh, et al. (2017), "Evaluation on the efficacy of post-op early enteral nutrition in rectal cancer patients", *Vietnam Journal of Science and Technology - MOST*, **15**(4), pp.6-9 (in Vietnamese).

[2] J.C. Montejo (1999), "Enteral nutrition-related gastrointestinal complications in critically ill patients: A multicenter study. The nutritional and metabolic working group of the Spanish society of intensive care medicine and coronary units", *Crit. Care Med.*, **27**(8), pp.1447-1453, DOI: 10.1097/00003246-199908000-00006.

[3] N.T. Luu (2019), *Nutritional Guidelines in The Treatment of Seriously Ill Patients*, Medical Publishing House, 83pp (in Vietnamese).

[4] T.T. Nguyen, T.T.H. Nguyen, V.D. Truong, et al. (2018), "Assessment of nutritional status and related factors in critically ill patients at the Infectious Intensive Care Unit in 108 Military Central Hospital", *Journal of 108 - Clinical Medicine and Pharmacy*, **13**(2), pp.140-149 (in Vietnamese).

[5] A. Gatta, A. Verardo, M. Bolognesi (2012), "Hypoalbuminemia", *Intern. Emerg. Med.*, **7**, pp.193-199, DOI: 10.1007/s11739-012-0802-0.

[6] H. Kim, S.C. Kwon (2011), "Changes in nutritional status in ICU patients receiving enteral tube feeding: A prospective descriptive study", *Intensive Crit. Care Nurs.*, **27**(4), pp.194-201, DOI: 10.1016/j.iccn.2011.05.002.

[7] P. Attaluri, A. Castillo, H. Edriss, et al. (2018), "Thiamine deficiency: An important consideration in critically ill patients", *Am. J. Med. Sci.*, **356**(4), pp.382-390, DOI: 10.1016/j.amjms.2018.06.015.

[8] B.F. Polegato, A.G. Pereira, P.S. Azevedo, et al. (2019), "Role of thiamin in health and disease", *Nutr. Clin. Pract.*, **34**(4), pp.558-564, DOI: 10.1002/ncp.10234.

[9] K.B. Christopher (2015), "Vitamin D supplementation in the ICU patient", *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, **18**(2), pp.187-192, DOI: 10.1097/MCO.0000000000000147.

[10] G. Elke, M. Lemieux, M. Kott, et al. (2016), "Enteral versus parenteral nutrition in critically ill patients: An updated systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials", *Crit. Care Lond. Engl.*, **20**(1), DOI: 10.1186/s13054-016-1298-1.

Mối liên quan giữa kháng thể kháng Topoisomerase I với tổn thương một số cơ quan trong bệnh xơ cứng bì hệ thống tại Bệnh viện Da liễu Trung ương

Đỗ Thị Thu Hiền^{1,2*}, Nguyễn Thị Hoa², Nguyễn Thị Kim Tiên^{2,3}

¹Bệnh viện Da liễu Trung ương, 15A Phương Mai, phường Phương Mai, quận Đống Đa, Hà Nội, Việt Nam

²Trường Đại học Y Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội, 144 Xuân Thủy, phường Dịch Vọng Hậu, quận Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

³Bệnh viện E, 89 Trần Cung, phường Nghĩa Tân, quận Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 6/3/2024; ngày chuyển phản biện 8/3/2024; ngày nhận phản biện 24/3/2024; ngày chấp nhận đăng 28/3/2024

Tóm tắt:

Mục tiêu: Đánh giá mối liên quan giữa kháng thể kháng Topoisomerase I (Topo I) và tổn thương một số cơ quan trong bệnh xơ cứng bì hệ thống (XCBHT). **Đối tượng và phương pháp:** Nghiên cứu mô tả cắt ngang trên 100 bệnh nhân được chẩn đoán xác định XCBHT và làm xét nghiệm tìm kháng thể kháng Topo I bằng kỹ thuật ELISA tại Bệnh viện Da liễu Trung ương. **Kết quả:** Điểm trung bình của mức độ ảnh hưởng toàn thân, tổn thương dày da, tổn thương mạch máu ngoại vi, tổn thương phổi theo thang điểm Medsger của nhóm bệnh nhân XCBHT có anti-Topo I dương tính (+) cao hơn nhóm bệnh nhân XCBHT có anti-Topo I âm tính (-) (lần lượt tương ứng là $0,93 \pm 1,07$ so với $0,24 \pm 0,44$; $1,6 \pm 0,7$ so với $1,16 \pm 0,37$; $1,88 \pm 0,61$ so với $1,36 \pm 0,49$; $1,23 \pm 0,67$ so với $0,84 \pm 0,94$). Tỷ lệ bệnh nhân có cơ cứng khớp trong nhóm anti-Topo I (+) cao hơn nhóm anti-Topo I (-) (32 so với 12%). Tỷ lệ bệnh nhân tổn thương các cơ quan ở mức độ nặng và rất nặng của nhóm anti-Topo I (+) cao hơn nhóm anti-Topo I (-). Không có mối liên quan giữa kháng thể kháng Topo I với tổn thương tim và tiêu hóa. **Kết luận:** Kháng thể kháng Topo I có liên quan đến ảnh hưởng toàn thân, tổn thương mạch máu ngoại vi, mức độ dày da và tổn thương xơ phổi. Sự có mặt kháng thể kháng Topo I là một yếu tố tiên lượng xấu cho bệnh nhân XCBHT.

Từ khóa: dày da, Topoisomerase I, xơ cứng bì hệ thống, xơ phổi.

Chỉ số phân loại: 3.2

1. Đặt vấn đề

XCBHT là một bệnh rối loạn mô liên kết tự miễn, với căn nguyên cơ chế bệnh sinh chưa rõ ràng [1]. Bệnh thường gặp thứ hai sau lupus ban đỏ hệ thống với tỷ lệ mắc mới hàng năm khoảng 20 trường hợp trên 1 triệu người [2, 3]. Bệnh gây tổn thương toàn bộ tổ chức liên kết với cơ chế bệnh sinh đặc trưng bởi 3 đặc điểm: tổn thương các mạch máu nhỏ, sản xuất tự kháng thể và rối loạn chức năng nguyên bào sợi dẫn tới sự tăng sản xuất, lắng đọng các sợi xơ ở tổ chức liên kết [3]. Vì vậy, trong XCBHT ngoài tổn thương ở da còn có tổn thương ở nhiều cơ quan nội tạng như phổi, thận, tiêu hóa, cơ xương khớp, gây rối loạn dẫn truyền, suy tim; tổn thương phổi gây tăng áp lực động mạch phổi, xơ phổi; tổn thương thận gây tăng huyết áp ác tính, xơ thận... [3].

Nhiều tự kháng thể có vai trò quan trọng trong cơ chế bệnh sinh của XCBHT đã được phát hiện như kháng thể kháng tâm động, kháng thể kháng Topo I, kháng thể kháng ARN polymerase I, II và III [4]. Trong số đó, kháng thể kháng Topo I đã được nghiên cứu khá đầy đủ về cấu trúc, cơ chế sinh bệnh, giá trị trong chẩn đoán và tiên lượng bệnh [4]. Giá trị của kháng thể kháng Topo I trong chẩn đoán XCBHT đã được công nhận qua việc đưa vào tiêu chuẩn

chẩn đoán mới của Hội Thấp khớp học Hoa Kỳ và Liên đoàn chống Thấp khớp châu Âu năm 2013 [5].

Trên thế giới có nhiều nghiên cứu về giá trị của kháng thể kháng Topo I và mối liên quan giữa kháng thể kháng Topo I với các tổn thương cơ quan trong XCBHT [6, 7]. Tuy nhiên ở Việt Nam, các nghiên cứu về kháng thể kháng Topo I nói chung và mối liên quan giữa kháng thể này với các tổn thương trong XCBHT nói riêng còn ít và chưa được thực hiện một cách hệ thống. Để góp phần tìm hiểu giá trị của kháng thể này trong việc theo dõi và tiên lượng bệnh, chúng tôi tiến hành đề tài: “Mối liên quan giữa kháng thể kháng Topo I với tổn thương một số cơ quan trong bệnh XCBHT”.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

100 bệnh nhân XCBHT được chẩn đoán xác định theo tiêu chuẩn chẩn đoán của Hội Thấp khớp học Hoa Kỳ và Liên đoàn chống Thấp khớp châu Âu năm 2013 [5] điều trị nội và ngoại trú tại Bệnh viện Da liễu Trung ương, được làm xét nghiệm tìm kháng thể kháng Topo I và đồng ý tham gia nghiên cứu. Tiêu chuẩn loại trừ gồm XCBHT kèm các biểu hiện của bệnh mô liên kết khác (Mixed connective tissue disease, Overlap). Bệnh nhân mắc các bệnh lý nội khoa khác không phải do XCBHT như suy thận mạn, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính...

*Tác giả liên hệ: Email: hienphuonglinh@yahoo.com

Association between anti-Topoisomerase I antibody and organ damage in systemic sclerosis at the National Hospital of Dermatology and Venereology

Thi Thu Hien Do^{1,2*}, Thi Hoa Nguyen², Thi Kim Tien Nguyen^{2,3}

¹National Hospital of Dermatology and Venereology,
15A Phuong Mai Street, Phuong Mai Ward, Dong Da District, Hanoi, Vietnam

²University of Medicine and Pharmacy, Vietnam National University - Hanoi,
144 Xuan Thuy Street, Dich Vong Hau Ward, Cau Giay District, Hanoi, Vietnam

³E Hospital, 89 Tran Cong Street,
Nghia Tan Ward, Cau Giay District, Hanoi, Vietnam

Received 6 March 2024; revised 24 March 2024; accepted 28 March 2024

Abstract:

Objectives: To evaluate the association between anti-Topoisomerase (Topo) I antibody and damage of some organs in systemic sclerosis (SSc). **Materials and methods:** Cross-sectional descriptive study of 100 patients diagnosed with SSc and were tested for anti-Topo I antibodies by ELISA technique at the National Hospital of Dermatology and Venereology. **Results:** The average score of general effects, thickened skin lesions, peripheral vascular damages, and lung damages according to the Medsger scale of the group of SSc patients with positive anti-Topo I was higher than SSc patients with negative anti-Topo I (0.93 ± 1.07 vs 0.24 ± 0.44 ; 1.6 ± 0.7 vs 1.16 ± 0.37 ; 1.88 ± 0.61 vs 1.36 ± 0.49 , and 1.23 ± 0.67 vs 0.84 ± 0.94 , respectively). The proportion of patients with joint contractures in the positive anti-Topo I group was higher than in the anti-Topo I negative group (32 vs 12%). The proportion of patients with severe and very severe organ damage in the anti-Topo I positive group was higher than in the anti-Topo negative group. There was no association between the presence of anti-Topo I and heart or digestive damage. **Conclusions:** Anti-Topo I antibodies were associated with the level of general effects, peripheral vascular damage, skin thickening, and pulmonary fibrosis. The presence of anti-Topo I antibodies would be a poor prognostic factor for patients with SSc.

Keywords: pulmonary fibrosis, skin thickening, systemic sclerosis, Topoisomerase I.

Classification number: 3.2

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Thiết kế nghiên cứu: Mô tả cắt ngang.

Địa điểm nghiên cứu: Các xét nghiệm siêu âm tim, điện tâm đồ được tiến hành tại Bệnh viện Lão khoa Trung ương và Viện Tim mạch, Bệnh viện Bạch Mai. Xét nghiệm đo chức năng hô hấp được tiến hành tại Trung tâm Dị ứng - Miễn dịch Lâm sàng và Trung tâm Hô hấp của Bệnh viện Bạch Mai. Xét nghiệm chụp cắt lớp lồng ngực độ phân giải cao thực hiện ở Khoa Chẩn đoán Hình ảnh, Bệnh viện Bạch Mai. Xét nghiệm tại Bệnh viện Da liễu Trung ương: các xét nghiệm antinuclear antibody (ANA) bằng miễn dịch huỳnh quang gián tiếp trên HEp-2, kháng thể kháng Topo I bằng kỹ thuật Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), công thức máu, sinh hóa máu, X-quang tim phổi.

Tiêu chí đánh giá mức độ tổn thương: Dựa theo bảng điểm Medsger được thể hiện ở bảng 1 [8].

Bảng 1. Bảng điểm Medsger [8].

Cơ quan	Điểm				
	0	1	2	3	4
Toàn trạng	Giảm cân	<5%	5-10%	10-15%	15-20%
	Hematocrit	>37%	33-37%	29-33%	25-29%
	Hemoglobin	>123	110-122	97-109	83-96
Da (m-Rodnan)	0	1-14	15-29	30-39	>40
Mạch máu ngoại vi	Không Raynaud, Raynaud cần thuốc giãn mạch	Raynaud cần thuốc giãn mạch	Sẹo rỗ đầu ngón	Loét nhỏ đầu ngón	Hoại tử đầu ngón
Khớp/gân (FTP - độ nắm bàn tay)	0-0,9 cm	1,0-1,9 cm	2,0-3,9 cm	4,0-4,9 cm	>5,0 cm
Phổi	DLCO	>80%	70-79%	50-69%	<50%
	FVC	>80%	70-79%	50-69%	<50%
	sPAP	<35 mmHg	35-49 mmHg	50-64 mmHg	≥65 mmHg
	X-quang	Không xơ	Có xơ		
Tim	Điện tim đồ	Bình thường	Rối loạn dẫn truyền	Loạn nhịp	Loạn nhịp cần điều trị
	EF	>50%	45-49%	40-44%	30-40%
Thận	Tiền sử đợt kịch phát và	Không	Có	Có	Có
	Creatinin (μmol/l)	<115	<132	132-212	213-442
Tiêu hóa		Thực quản độ bình thường, di động ruột non bình thường	Giảm nhu động thực quản đầu xa, bất thường nhu động ruột non	Nhiễm khuẩn tiêu hóa tái phát cần điều trị kháng sinh	Hội chứng kém hấp thu; đợt giả tắc ruột
					Cần nuôi dưỡng đường tĩnh mạch
Cơ (đánh giá cơ cánh tay, cơ đùi)	Bình thường	Yếu nhẹ	Yếu vừa	Yếu nặng	Cần hỗ trợ khi đi chuyển

Xử lý số liệu: Số liệu được xử lý bằng phần mềm SPSS 16.0. Các số liệu định lượng được biểu hiện dưới dạng giá trị trung bình cộng sai số chuẩn (mean $\pm$ SD). Các số liệu định tính được biểu hiện dưới dạng tỷ lệ %. Kiểm định so sánh đối với biến định tính trong cùng một nhóm dùng test χ^2 McNemar, so sánh giữa hai nhóm sử dụng test so sánh χ^2 Chi-square. Đối với biến định lượng so sánh các giá trị bằng test T giữa hai mẫu độc lập. Các so sánh có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$

2.3. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu này được thông qua Hội đồng đạo đức và được phép của Bệnh viện Da liễu Trung ương.

3. Kết quả

Trong số 100 bệnh nhân XCBHT có 75 bệnh nhân có kháng thể kháng Topo I (+) và 25 bệnh nhân có kháng thể kháng Topo I (-) (bảng 2). Ảnh hưởng toàn thân mức độ nhẹ (độ 0, 1) gặp ở cả hai nhóm. Ảnh hưởng toàn thân mức độ trung bình và nặng (độ 2, 3, 4) chỉ gặp ở nhóm bệnh nhân có anti-Topo I (+). Mức độ ảnh hưởng toàn thân trung bình của nhóm bệnh nhân XCBHT có anti-Topo I (+) ($0,93 \pm 1,07$) cao hơn nhóm bệnh nhân XCBHT có anti-Topo I (-) ($0,24 \pm 0,44$), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p = 0,002$).

Bảng 2. Liên quan giữa kháng thể kháng Topoisomerase I và ảnh hưởng toàn thân.

Mức độ	Anti-Topo I (+)		Anti-Topo I (-)		p
	n=75	%	n=25	%	
0	34	45,30	19	76	
1	21	28,00	6	24	
2	13	17,30	0	0	
3	5	6,70	0	0	
4	2	2,70	0	0	
Trung bình	$0,93 \pm 1,07$	100	$0,24 \pm 0,44$	100	0,002

Kết quả bảng 3 cho thấy, tổn thương dày da gặp với tỷ lệ cao trong XCBHT. Dày da mức độ nặng (độ 3) và rất nặng (độ 4) chỉ gặp ở bệnh nhân có anti-Topo I (+), không gặp ở bệnh nhân có anti-Topo I (-). Điểm trung bình dày da theo thang điểm m-Rodnan của nhóm bệnh nhân XCBHT có anti-Topo I (+) ($1,6 \pm 0,7$) cao hơn nhóm bệnh nhân XCBHT có anti-Topo I (-) ($1,16 \pm 0,37$), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p = 0,003$).

Bảng 3. Liên quan giữa kháng thể kháng Topoisomerase I và tổn thương dày da.

Mức độ	Anti-Topo I (+)		Anti-Topo I (-)		p
	n=75	%	n=25	%	
0	1	1,3	0	0	
1	33	46,7	21	84	
2	35	64,0	4	16	
3	5	6,7	0	0	
4	1	1,3	0	0	
Trung bình	$1,6 \pm 0,7$	100	$1,16 \pm 0,37$	100	0,003

Nồng độ kháng thể kháng Topo I và điểm dày da theo thang điểm m-Rodnan ở bệnh nhân XCBHT có tương quan tuyến tính đồng biến ($r = 0,393$), mối tương quan này có ý nghĩa thống kê ($p < 0,001$).

Tổn thương mạch máu ngoại vi thường gặp trong XCBHT. Ảnh hưởng mạch máu ngoại vi mức độ nặng chỉ gặp ở bệnh nhân có anti-Topo I (+), không gặp ở bệnh nhân có anti-Topo I (-). Mức độ ảnh hưởng mạch máu ngoại vi của nhóm bệnh nhân XCBHT có anti-Topo I (+) ($1,88 \pm 0,61$) cao hơn nhóm bệnh nhân XCBHT có anti-Topo I (-) ($1,36 \pm 0,49$), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,001$) (bảng 4).

Bảng 4. Liên quan giữa kháng thể kháng Topoisomerase I và tổn thương mạch máu ngoại vi.

Mức độ	Anti-Topo I (+)		Anti-Topo I (-)		p
	n=75	%	n=25	%	
0	1	1,3	0	0	
1	16	21,3	16	64	
2	49	65,4	9	36	
3	9	12,0	0	0	
4	0	0	0	0	
Trung bình	$1,88 \pm 0,61$	100	$1,36 \pm 0,49$	100	<0,001

Kết quả bảng 5 cho thấy, tỷ lệ bệnh nhân XCBHT bị co cứng khớp ở nhóm anti-Topo I (+) cao hơn nhóm anti-Topo I (-) (32 và 12%), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p = 0,041$).

Bảng 5. Liên quan giữa kháng thể kháng Topoisomerase I và co cứng khớp.

	Anti-Topo I (+)		Anti-Topo I (-)		p
	n=75	%	n=25	%	
Có co cứng khớp	24	32	3	12	0,041
Không co cứng khớp	51	68	22	88	
Tổng	75	100	25	100	

Bảng 6. Liên quan giữa kháng thể kháng Topoisomerase I và tổn thương phổi.

Mức độ	Anti-Topo I (+)		Anti-Topo I (-)		p
	n=75	%	n=25	%	
0	8	10,7	11	44	
1	44	58,7	9	36	
2	21	28,0	3	12	
3	2	2,7	2	8	
4	0	0	0	0	
Trung bình	$1,23 \pm 0,67$	100	$0,84 \pm 0,94$	100	0,027

Điểm trung bình tổn thương phổi theo thang điểm Medsger của nhóm bệnh nhân XCBHT có anti-Topo I (+) ($1,23 \pm 0,67$) cao hơn nhóm bệnh nhân XCBHT có anti-Topo I (-) ($0,84 \pm 0,94$), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p = 0,027$) (bảng 6). Nghiên cứu cũng cho thấy, tỷ lệ bệnh nhân xơ phổi ở nhóm bệnh nhân XCBHT có anti-Topo I (+) (81,3%) cao hơn nhóm bệnh nhân XCBHT có anti-Topo I (-) (48%), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,001$).

Bảng 7. Liên quan giữa kháng thể kháng Topoisomerase I và tổn thương tim.

Mức độ	Anti-Topo I (+)		Anti-Topo I (-)		p
	n=75	%	n=25	%	
0	67	89,3	24	96	
1	5	6,7	1	4	
2	1	1,3	0	0	
3	2	2,7	0	0	
4	0	0	0	0	
Trung bình	0,17±0,58	100	0,04±0,2	100	0,09

Đa số bệnh nhân có tổn thương tim đều có anti-Topo I (+). Điểm trung bình tổn thương tim theo thang điểm Medsger của nhóm bệnh nhân XCBHT có kháng thể kháng Topo I (+) (0,17±0,58) cao hơn nhóm bệnh nhân XCBHT có kháng thể kháng Topo I (-) (0,04±0,2), sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê (p=0,09) (bảng 7).

Bảng 8. Liên quan giữa kháng thể kháng Topoisomerase I và tổn thương tiêu hóa.

Mức độ	Anti-Topo I (+)		Anti-Topo I (-)		p
	n=75	%	n=25	%	
0	47	62,7	13	52	
1	22	29,3	12	48	
2	4	5,3	0	0	
3	2	2,7	0	0	
4	0	0	0	0	
Trung bình	0,48±0,72	100	0,48±0,51	100	1

Tổn thương tiêu hóa mức độ trung bình và nặng (độ 2, 3) chỉ gặp ở bệnh nhân có anti-Topo I (+), không gặp ở bệnh nhân có anti-Topo I (-). Điểm trung bình tổn thương tiêu hóa theo thang điểm Medsger của nhóm bệnh nhân XCBHT có kháng thể kháng Topo I (+) (0,48±0,72) tương đương nhóm bệnh nhân XCBHT có kháng thể kháng Topo I (-) (0,48±0,51) (bảng 8).

4. Bàn luận

Để đánh giá ảnh hưởng toàn thân của XCBHT lên bệnh nhân, đa số nghiên cứu sử dụng các thang điểm đánh giá tác động chung của bệnh lên bệnh nhân như bộ câu hỏi đánh giá sức khỏe chung (Health assessment questionnaire - HAQ), thang điểm nhìn đặc hiệu cho XCBHT (Scleroderma - specific visual analog scales), thang điểm SF-36 (Short Form 36) [9-11]. Các thang điểm này dựa nhiều vào chủ quan của bệnh nhân và thường thiên về đánh giá chất lượng cuộc sống và thể hiện mức độ của cơ quan tổn thương nặng nhất chứ không phải ảnh hưởng chung. Một số nghiên cứu khác đánh giá dựa vào tình trạng thiếu máu của bệnh nhân như P.M. Campbell và cs (1975) [12], R.N.A. Adhadi và cs (2001) [13]. Nghiên cứu của chúng tôi sử dụng thang điểm Medsger với tổng hợp của 3 thông số là mức độ sụt cân,

hematocrit và hemoglobin giúp đánh giá chính xác hơn, đã được sự đồng thuận của các chuyên gia về XCBHT [14]. Kết quả của nghiên cứu cho thấy, nhóm bệnh nhân XCBHT có kháng thể kháng Topo I (+) bị ảnh hưởng toàn thân nặng hơn nhóm có kháng thể kháng Topo I (-). Nhóm bệnh nhân XCBHT kháng thể kháng Topo I (+) gặp 9,4% bệnh nhân có mức độ nặng đến rất nặng, trong khi nhóm kháng thể kháng Topo I (-) chỉ gặp ảnh hưởng toàn thân ở mức độ 0 (không ảnh hưởng) và mức độ 1 (ảnh hưởng ít), không có bệnh nhân nào có mức độ trung bình đến rất nặng. Điểm trung bình cho ảnh hưởng toàn thân của nhóm bệnh nhân XCBHT có kháng thể kháng Topo I (+) (0,93±1,07) cao hơn nhóm bệnh nhân XCBHT có kháng thể kháng Topo I (-) (0,24±0,44), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (p=0,002). Điều này cũng phù hợp với các nghiên cứu khác cho thấy nhóm bệnh nhân XCBHT có kháng thể kháng Topo I (+) thường kết hợp với thể có tổn thương da lan tỏa và ảnh hưởng nặng đến nhiều cơ quan [15, 16]. Đồng thời kết quả của chúng tôi cũng giúp đưa thêm bằng chứng cho giá trị của thang điểm Medsger.

Tổn thương da được xem là đặc trưng của XCBHT và được đánh giá qua điểm dày da bằng thang điểm m-Rodnan [17]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, nhóm bệnh nhân XCBHT có kháng thể kháng Topo I (+) gặp tổn thương dày da ở tất cả các mức độ. Trong khi đó, nhóm bệnh nhân XCBHT có Topo I (-) không gặp tổn thương dày da ở mức độ 3 (ảnh hưởng nặng) và mức độ 4 (ảnh hưởng rất nặng). Điểm trung bình tổn thương da theo thang điểm Medsger của nhóm bệnh nhân XCBHT có kháng thể kháng Topo I (+) (1,6±0,7) cao hơn nhóm bệnh nhân XCBHT có kháng thể kháng Topo I (-) (1,16±0,37), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (p=0,003). Có mối tương quan giữa nồng độ kháng thể kháng Topo I và mức độ dày da, nồng độ kháng thể kháng Topo I càng cao, mức độ dày da càng nặng (p<0,001). Mối tương quan này cũng được khẳng định trong các nghiên cứu của P.Q. Hu và cs (2003) [6] r=0,61, p<0,000001; S. Sato và cs (2001) [7] r=0,529, p<0,01; K. Hanke và cs (2009) [18] cho kết quả r=0,413, p=0,01.

Nhóm bệnh nhân XCBHT có kháng thể kháng Topo I (+) có thể gặp tổn thương mạch máu ngoại vi ở các mức độ khác nhau, trong đó có 9 bệnh nhân (12%) bị ảnh hưởng ở mức độ 3 (ảnh hưởng nặng). Nhóm bệnh nhân XCBHT có kháng thể kháng Topo I (-) gặp tổn thương mạch máu ngoại vi ở mức độ 1 (ảnh hưởng ít) và mức độ 2 (ảnh hưởng trung bình), không có bệnh nhân nào bị ảnh hưởng nặng. Điểm trung bình cho ảnh hưởng mạch máu ngoại vi của nhóm bệnh nhân XCBHT có kháng thể kháng Topo I (+) (1,88±0,61) cao hơn nhóm bệnh nhân XCBHT có kháng thể kháng Topo I (-) (1,36±0,49), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (p=0,001). Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu trước đây của E.S. Weiner và cs (1988) [19], P.L. Meroni và cs (2014) [20]. Các tác giả này đều cho thấy kháng thể kháng Topo I liên quan đến tổn thương loét đầu ngón. Như vậy, tổn thương mạch máu ngoại vi xuất

hiện nhiều hơn và nặng nề hơn ở bệnh nhân XCBHT có kháng thể kháng Topo I so với nhóm không có kháng thể kháng Topo I. Đây là tổn thương dễ thăm khám trên lâm sàng và có thể để lại hậu quả nặng nề nếu không được phát hiện và xử trí sớm. Kháng thể kháng Topo I (+) là gợi ý để bác sỹ chú ý tìm các tổn thương mạch máu ngoại vi trên bệnh nhân XCBHT để có phương pháp điều trị phù hợp.

Tổn thương khớp tương đối hay gặp trong XCBHT với biểu hiện đa dạng, bao gồm viêm khớp, đau khớp, co cứng khớp, hẹp khe khớp trên X-quang [21, 22]. Trong đó, co cứng khớp bàn ngón và khớp gian đốt gần thể hiện qua độ nắm bàn tay FTP (Finger-to-palm distance in flexion - Khoảng cách từ ngón tay đến lòng bàn tay khi nắm) được xem là yếu tố để đánh giá mức độ nặng và mức độ hoạt động của bệnh. Vì vậy, thang điểm Medsger sử dụng chỉ số FTP làm đại diện để đánh giá tổn thương xương, khớp cho bệnh nhân XCBHT. Khi so sánh tỷ lệ có co cứng khớp ở 2 nhóm có Topo I (+) và (-) thấy giá trị tương ứng là 32 và 12% ($p=0,041$). Khi tính hệ số tương quan, tương quan giữa nồng độ kháng thể kháng Topo I và FTP là mối tương quan đồng biến yếu và không có ý nghĩa thống kê ($r=0,172$, $p=0,087$). Nghiên cứu của S. Sato và cs (2001) [7] đánh giá trên 125 mẫu huyết thanh của 21 bệnh nhân theo dõi trong 0,2-4,7 năm cũng cho thấy, nồng độ kháng thể kháng Topo I ở nhóm có viêm khớp/đau khớp cao hơn nhóm không có tổn thương khớp ($p<0,02$). K. Hanke và cs (2009) [18] nghiên cứu trên 209 bệnh nhân đưa ra tỷ lệ co cứng khớp ở nhóm bệnh nhân có kháng thể kháng Topo I (+) cao hơn nhóm kháng thể kháng Topo I (-) với 88,1 và 53,1% ($p<0,0005$).

Trong XCBHT, tổn thương phổi gặp với tần suất cao ở cả hai thể bệnh và là nguyên nhân gây tử vong nhiều nhất. Tổn thương phổi có thể gặp rất đa dạng từ tổn thương màng phổi, tổn thương nhu mô phổi đến tổn thương các mạch máu phổi [3]. Trong thang điểm Medsger, tổn thương phổi được đánh giá dựa vào 3 yếu tố là tình trạng xơ phổi, chỉ số FVC và chỉ số sPAP với 5 mức độ tổn thương từ 0 đến 4. Kết quả chung cho thấy, điểm trung bình tổn thương phổi theo thang điểm Medsger của nhóm bệnh nhân XCBHT có kháng thể kháng Topo I (+) ($1,23\pm0,67$) cao hơn nhóm bệnh nhân XCBHT có kháng thể kháng Topo I (-) ($0,84\pm0,94$), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p=0,027$). Tỷ lệ bệnh nhân xơ phổi ở nhóm bệnh nhân XCBHT có kháng thể kháng Topo I (+) cao hơn tỷ lệ này ở nhóm có kháng thể kháng Topo I (-) với 81,3 và 48% ($p<0,001$). Mối liên quan này cũng đã được khẳng định trong nhiều nghiên cứu trước. Kháng thể kháng Topo I kết hợp với xơ phổi không chỉ về tỷ lệ mà còn về mức độ nặng [23, 24]. K. Hanke và cs (2009) [18] nghiên cứu trên 209 bệnh nhân XCBHT nhận thấy, tỷ lệ xơ phổi ở nhóm kháng thể kháng Topo I (+) và (-) lần lượt là 68,6 và 23,3% ($p<0,0005$). Kết quả này thấp hơn của chúng tôi có thể do bệnh nhân người Việt Nam thường đi khám muộn với tổn thương nặng

hơn, khi tình trạng xơ phổi đã phát triển. Như vậy, kháng thể kháng Topo I có liên quan đến tổn thương phổi nói chung, trong đó liên quan chặt chẽ đến tình trạng xơ phổi.

Tổn thương tim có thể gặp trên bệnh nhân XCBHT rất đa dạng, có thể là tổn thương nguyên phát hoặc thứ phát do tổn thương thận và phổi. Tỷ lệ gặp tổn thương tim không cao nhưng đây là tổn thương nặng và dễ gây tử vong. Để đánh giá tổn thương tim, hai thăm dò quan trọng nhất là điện tâm đồ và siêu âm tim đều được chúng tôi sử dụng trong nghiên cứu này. Kết quả cho thấy, trong nhóm bệnh nhân XCBHT có kháng thể kháng Topo I (+) có thể gặp tổn thương tim ở các mức độ từ 0 đến 3; trong nhóm bệnh nhân XCBHT có kháng thể kháng Topo I (-) chỉ gặp tổn thương tim ở mức độ 0 (không ảnh hưởng) và 1 (ảnh hưởng ít). Điểm trung bình tổn thương tim theo thang điểm Medsger của nhóm bệnh nhân XCBHT có kháng thể kháng Topo I (+) ($0,17\pm0,58$) cao hơn nhóm bệnh nhân XCBHT có kháng thể kháng Topo I (-) ($0,04\pm0,2$), sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p=0,09$). Kết quả này giống với nghiên cứu của K. Hanke và cs (2009) [18], C. Ferri và cs (2002) [25] là không tìm thấy mối liên quan giữa kháng thể kháng Topo I và tổn thương tim mạch.

Tổn thương tiêu hóa rất thường gặp trên bệnh nhân XCBHT với tỷ lệ khoảng 80%, đứng thứ hai sau tổn thương da nhưng lại dễ bị thầy thuốc bỏ qua khi thăm khám. Bệnh lý đường tiêu hóa thường không gây tử vong nhưng ảnh hưởng rất nhiều đến chất lượng cuộc sống của bệnh nhân với các biểu hiện thường gặp là rối loạn nhu động ruột, kém hấp thu, giả tắc ruột [3, 26, 27]. Nghiên cứu của chúng tôi sơ bộ đánh giá tổn thương tiêu hóa qua việc hỏi các triệu chứng cơ năng của bệnh nhân. Kết quả cho thấy, nhóm bệnh nhân XCBHT có kháng thể kháng Topo I (+) gặp tổn thương tiêu hóa ở các mức độ từ 0 đến 3; trong nhóm bệnh nhân XCBHT có kháng thể kháng Topo I (-) chỉ gặp tổn thương tiêu hóa ở mức độ 0 (không ảnh hưởng) và mức độ 1 (ảnh hưởng ít). Điểm trung bình tổn thương tiêu hóa theo thang điểm Medsger của nhóm bệnh nhân XCBHT có kháng thể kháng Topo I (+) ($0,48\pm0,72$) tương đương nhóm bệnh nhân XCBHT có kháng thể kháng Topo I (-) ($0,48\pm0,51$). Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của K. Hanke và cs (2009) [18] khi không thấy kháng thể kháng Topo I liên quan đến tổn thương tiêu hóa. Từ đó có thể thấy, tổn thương tiêu hóa là thường gặp trên bệnh nhân XCBHT nhưng không có liên quan đến kháng thể kháng Topo I.

5. Kết luận

Xơ cứng bì hệ thống là bệnh tự miễn của tổ chức liên kết với kháng thể kháng Topo I xuất hiện ở 75% bệnh nhân. Bệnh nhân XCBHT có kháng thể kháng Topo I (+) mức độ tổn thương các cơ quan như da, mạch máu ngoại vi và các cơ quan nội tạng nặng hơn nhóm (-). Sự có mặt của kháng thể kháng Topo I là một yếu tố tiên lượng xấu cho bệnh nhân XCBHT.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] R. Adigun, A. Goyal, A. Hariz (2022), "Systemic sclerosis", *StatPearls [Internet]*, StatPearls Publishing, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430875/>, accessed 1 March 2024.
- [2] M.D. Mayes, J.V. Lacey, J.B. Dimmer, et al. (2003), "Prevalence, incidence, survival, and disease characteristics of systemic sclerosis in a large US population", *Arthritis Rheum.*, **48(8)**, pp.2246-2255, DOI: 10.1002/art.11073.
- [3] A.G. Lowell, I.K. Stephen, G. Barbara, et al. (2012), *Fitzpatrick's Dermatology General in Medicine*, **2**, Mc Graw Hill, 3076pp.
- [4] Y. Hamaguchi (2010), "Autoantibody profiles in systemic sclerosis: Predictive value for clinical evaluation and prognosis", *J. Dermatol.*, **37(1)**, pp.42-53, DOI: 10.1111/j.1346-8138.2009.00762.x.
- [5] F.V.D. Hoogen, D. Khanna, J. Fransen, et al. (2013), "Classification criteria for systemic sclerosis: An American college of rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative", *Ann. Rheum. Dis.*, **72(11)**, pp.1747-1755, DOI: 10.1136/annrheumdis-2013-204424.
- [6] P.Q. Hu, N. Fertig, T.A. Medsger, et al. (2003), "Correlation of serum anti-DNA Topoisomerase I antibody levels with disease severity and activity in systemic sclerosis", *Arthritis Rheum.*, **48(5)**, pp.1363-1373, DOI: 10.1002/art.10977.
- [7] S. Sato, Y. Hamaguchi, M. Hasegawa, et al. (2001), "Clinical significance of anti-Topoisomerase I antibody levels determined by ELISA in systemic sclerosis", *Rheumatology (Oxford)*, **40(10)**, pp.1135-1140, DOI: 10.1093/rheumatology/40.10.1135.
- [8] T.A. Medsger, A.J. Silman, V.D. Steen, et al. (1999), "A disease severity scale for systemic sclerosis: Development and testing", *J. Rheumatol.*, **26(10)**, pp.2159-2167.
- [9] V.D. Steen, T.A. Medsger (1997), "The value of the health assessment questionnaire and special patient-generated scales to demonstrate change in systemic sclerosis patients over time", *Arthritis Rheumatol.*, **40(11)**, pp.1984-1991, DOI: 10.1002/art.1780401110.
- [10] J.E. Ware, B. Gandek (1998), "Overview of the SF-36 health survey and the International Quality of Life Assessment (IQOLA) project", *J. Clin. Epidemiol.*, **51(11)**, pp.903-912, DOI: 10.1016/s0895-4356(98)00081-x.
- [11] J.F. Fries, P.W. Spitz, D.Y. Young (1982), "The dimensions of health outcomes: The health assessment questionnaire, disability and pain scales", *J. Rheumatol.*, **9(5)**, pp.789-793.
- [12] P.M. Campbell, E.C. LeRoy (1975), "Pathogenesis of systemic sclerosis: A vascular hypothesis", *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, **4(4)**, pp.351-368, DOI: 10.1016/0049-0172(75)90017-7.
- [13] R.N.A. Adhath, T.A.A. Sayed (2001), "Clinical features of systemic sclerosis", *Saudi Med. J.*, **22(4)**, pp.333-336.
- [14] T.A. Medsger, S. Bombardieri, L. Czirjak, et al. (2003), "Assessment of disease severity and prognosis", *Clin. Exp. Rheumatol.*, **21(3)**, Suppl. 29, pp.S42-S46.
- [15] J.G. Walker, M.J. Fritzler (2007), "Update on autoantibodies in systemic sclerosis", *Curr. Opin. Rheumatol.*, **19(6)**, pp.580-591, DOI: 10.1097/BOR.0b013e3282e7d8f9.
- [16] S.I. Nihtyanova, C.P. Denton (2010), "Autoantibodies as predictive tools in systemic sclerosis", *Nat. Rev. Rheumatol.*, **6(2)**, pp.112-116, DOI: 10.1038/nrrheum.2009.238.
- [17] P. Clements, P. Lachenbruch, J. Siebold, et al. (1995), "Inter and intraobserver variability of total skin thickness score (modified Rodnan TSS) in systemic sclerosis", *J. Rheumatol.*, **22(7)**, pp.1281-1285.
- [18] K. Hanke, C. Dähnrich, C.S. Brückner, et al. (2009), "Diagnostic value of anti-topoisomerase I antibodies in a large monocentric cohort", *Arthritis Res. Ther.*, **11(1)**, DOI: 10.1186/ar2622.
- [19] E.S. Weiner, W.C. Earnshaw, J.L. Senécal, et al. (1988), "Clinical associations of anticentromere antibodies and antibodies to topoisomerase I. A study of 355 patients", *Arthritis Rheum.*, **31(3)**, pp.378-385, DOI: 10.1002/art.1780310309.
- [20] P.L. Meroni, M. Biggioggero, S.S. Pierangeli, et al. (2014), "Standardisation of autoantibody testing: A paradigm for serology in rheumatic diseases", *Nat. Rev. Rheumatol.*, **10(1)**, pp.35-43, DOI: 10.1038/nrrheum.2013.180.
- [21] J.E. Pope (2003), "Musculoskeletal involvement in scleroderma", *Rheum. Dis. Clin. North Am.*, **29(2)**, pp.391-408, DOI: 10.1016/s0889-857x(03)00017-6.
- [22] R. Misra, K. Darton, R.F. Jewkes, et al. (1995), "Arthritis in scleroderma", *Rheumatol.*, **34(9)**, pp.831-837, DOI: 10.1093/rheumatology/34.9.831.
- [23] V.D. Steen, D.L. Powell, T.A. Medsger (1988), "Clinical correlations and prognosis based on serum autoantibodies in patients with systemic sclerosis", *Arthritis Rheum.*, **31(2)**, pp.196-203, DOI: 10.1002/art.1780310207.
- [24] E. Diot, B. Giraudeau, P. Diot, et al. (1999), "Is anti-Topoisomerase I a serum marker of pulmonary involvement in systemic sclerosis?", *Chest.*, **116(3)**, pp.715-720, DOI: 10.1378/chest.116.3.715.
- [25] C. Ferri, G. Valentini, F. Cozzi, et al. (2002), "Systemic sclerosis: Demographic, clinical, and serologic features and survival in 1,012 Italian patients", *Medicine (Baltimore)*, **81(2)**, pp.139-153, DOI: 10.1097/00005792-200203000-00004.
- [26] E. Savarino, M. Furnari, N.D. Bortoli, et al. (2014), "Gastrointestinal involvement in systemic sclerosis", *Presse Med.*, **43(10)**, Pt. 2, pp.e279-e291, DOI: 10.1016/j.lpm.2014.03.029.
- [27] G.D. Maggio, P. Confalonieri, F. Salton, et al. (2003), "Biomarkers in systemic sclerosis: An overview", *Curr. Issues Mol. Biol.*, **45(10)**, pp.7775-7802, DOI: 10.3390/cimb45100490.

Nghiên cứu chế tạo kit LAMP chẩn đoán sán lá gan nhỏ *Clonorchis sinensis* nhiễm trên người

Phạm Thị Hà Trang^{1*}, Trương Văn Hạnh², Trần Thanh Dương³, Hoàng Đình Cảnh²

¹Sở Y tế Hà Nội, 4 Sơn Tây, phường Điện Biên, quận Ba Đình, Hà Nội, Việt Nam

²Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng Trung ương, 34 Trung Văn, phường Trung Văn, quận Nam Từ Liêm, Hà Nội, Việt Nam

³Viện Dinh dưỡng Quốc gia, 48 Tăng Bạt Hổ, phường Phạm Đình Hổ, quận Hai Bà Trưng, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 3/1/2024; ngày chuyển phản biện 5/1/2024; ngày nhận phản biện 26/1/2024; ngày chấp nhận đăng 30/1/2024

Tóm tắt:

Đặt vấn đề: *Clonorchis sinensis* là một trong ba loài sán lá gan nhỏ gây bệnh trên người, lưu hành chủ yếu ở châu Á và miền Bắc Việt Nam. LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) có độ nhạy, đặc hiệu tương đương với PCR nhưng yêu cầu về trang thiết bị xét nghiệm đơn giản hơn so với PCR. **Phương pháp nghiên cứu:** Nghiên cứu thực nghiệm chế tạo kit LAMP chẩn đoán *C. sinensis*, đánh giá kit LAMP tại phòng thí nghiệm và thực địa hẹp với 150 mẫu phân thu thập từ người dân sống trong vùng dịch tễ sán lá gan nhỏ. **Kết quả:** Thiết kế, lựa chọn bộ môi LAMP, tối ưu điều kiện và thành phần của phản ứng LAMP chẩn đoán *C. sinensis*. Kết quả đánh giá kit LAMP tại phòng thí nghiệm cho độ nhạy là 98,63% (95% CI: 91,92-99,99%), độ đặc hiệu 100% (95% CI: 85,25-100%), ngưỡng giới hạn phát hiện tối thiểu 26 bản sao gen/μl, độ ổn định là 12 tháng (bảo quản -20±5°C) và 6 tháng kể từ ngày mở nắp. **Đánh giá kit LAMP tại tỉnh Ninh Bình** phát hiện tỷ lệ nhiễm *C. sinensis* là 6,66%, tương đồng với xét nghiệm bằng real-time PCR. **Kết luận:** Chế tạo được kit LAMP chẩn đoán *C. sinensis* có độ nhạy, độ đặc hiệu cao >95%, độ ổn định của kit là 12 tháng trong điều kiện bảo quản -20±5°C và 6 tháng kể từ ngày mở nắp sản phẩm.

Từ khóa: kit LAMP, real-time PCR, sán lá gan nhỏ.

Chỉ số phân loại: 3.3

1. Đặt vấn đề

C. sinensis là một trong ba loài sán lá gan nhỏ gây bệnh ở người. Trên thế giới, ước tính có khoảng 35 triệu người nhiễm sán lá gan nhỏ *C. sinensis*, lưu hành chủ yếu ở một số quốc gia châu Á bao gồm Hàn Quốc, Triều Tiên, Nhật Bản, Trung Quốc và các tỉnh miền Bắc Việt Nam [1]. Tại Việt Nam, sán lá gan nhỏ *C. sinensis* lưu hành ở ít nhất 22 tỉnh/thành phố phía Bắc, tỷ lệ nhiễm sán lá gan nhỏ có khác nhau ở các điểm nghiên cứu, một số vùng dịch tễ có tỷ lệ nhiễm cao như ở Nam Định lên tới 37% và Ninh Bình khoảng 20-30% [2].

Đến nay, xét nghiệm phát hiện nhiễm sán lá gan nhỏ trên người chủ yếu được thực hiện bằng kỹ thuật Kato-Katz để tìm trứng sán trong phân. Tuy vậy, kỹ thuật này có độ nhạy thấp, không phân biệt được trứng giữa các loài sán lá gan nhỏ, có thể nhầm lẫn với trứng các loài sán lá ruột khác [3]. Các kỹ thuật xét nghiệm miễn dịch như ELISA ít được sử dụng do có độ phức tạp hơn và nhiều bằng chứng cho thấy có tỷ lệ dương tính giả nhất định.

Chẩn đoán bằng sinh học phân tử thường sử dụng các gen đích ITS1, ITS2 và DNA ty thể với các kỹ thuật PCR, real-time PCR để chẩn đoán sán lá gan nhỏ cho độ nhạy và độ đặc hiệu cao. Tuy vậy, chưa được áp dụng rộng rãi do giá thành cao và khâu kỹ thuật phức tạp, không triển khai được tại thực địa [4].

LAMP là kỹ thuật sinh học phân tử mới được nghiên cứu và phát triển năm 1998. Thành phần phản ứng gồm có DNA khuôn, môi, enzyme Bst DNA polymerase, hỗn hợp phản ứng và được ủ

ở 65°C. Phương pháp này có hiệu quả khuếch đại cao khoảng 10^9 - 10^{10} bản sao trong 15-60 phút. Ưu điểm vượt trội của kỹ thuật này là có độ nhạy, độ đặc hiệu cao tương đương với các phương pháp PCR, DNA làm khuôn khuếch đại không đòi hỏi độ tinh sạch cao. Kết quả của phản ứng LAMP có thể được quan sát trực tiếp bằng mắt thường. Thời gian xét nghiệm nhanh khoảng 60 phút. Trong nghiên cứu này, chúng tôi lựa chọn kỹ thuật LAMP để nghiên cứu, phát triển và ứng dụng trong xét nghiệm chẩn đoán nhiễm sán lá gan nhỏ *C. sinensis* trên người, hiện chưa có sản phẩm kit LAMP chẩn đoán sán lá gan nhỏ được thương mại trên thế giới và Việt Nam.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

- Đối tượng nghiên cứu:

+ Sán lá gan nhỏ *C. sinensis*.

+ Con trưởng thành hoặc ấu trùng của một số loài sán, giun khác thu thập từ người hoặc động vật gồm: *Haplorchis taichui*, *H. pumilo*, *Fasciola gigantica*, *Paragonimus heterotremus*, *Taenia solium*, *Ancylostoma duodenale*, *Ascaris lumbricoides*, *Opisthorchis viverrini*.

+ Người dân sống trong vùng dịch tễ sán lá gan nhỏ *C. sinensis*.

- Thời gian: Nghiên cứu được tiến hành từ năm 2018-2020.

- Địa điểm: Phòng Thí nghiệm sinh học phân tử, Viện Sốt rét -

*Tác giả liên hệ: Email: hatrangpham89@gmail.com

Study on producing a LAMP kit for diagnosis of small liver fluke *Clonorchis sinensis* infection in humans

Thi Ha Trang Pham^{1*}, Van Hanh Truong²,
Thanh Duong Tran³, Dinh Canh Hoang²

¹Hanoi Department of Health,

4 Son Tay Street, Dien Bien Ward, Ba Dinh District, Hanoi, Vietnam

²National Institute of Malaria Parasitology and Entomology,

34 Trung Van Street, Trung Van Ward, Nam Tu Liem District, Hanoi, Vietnam

³National Institute of Nutrition, 48 Tang Bat Ho Street,

Pham Dinh Ho Ward, Hai Ba Trung District, Hanoi, Vietnam

Received 3 January 2024; revised 26 January 2024; accepted 30 January 2024

Abstract:

Background: *Clonorchis sinensis* is one of the three species of small liver flukes that cause infections in humans. *C. sinensis* is found mainly in several Asian countries and Northern, Vietnam. The Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) with a sensitivity and specificity comparable to that of the PCR method, which requires less complex equipment and facilities for performance. **Methods:** The research design describes the laboratory experiment and evaluates a LAMP kit for the diagnosis of *C. sinensis* in the laboratory and the small-scale field assessment, using 150 human stool samples from fascioliasis endemic areas. **Results:** The LAMP primer sets have been designed and selected; the conditions and components of the LAMP reaction for *C. sinensis* diagnosis have been optimised. Evaluation results of the LAMP kit in the laboratory showed a sensitivity of the test was 98.63% (95% CI: 91.92-99.99%); a specificity was 100% (95% CI: 85.25-100%); the limit of detection was 26 gene copies/μl. The LAMP test kit was found to be stable within 12 months at -20±5°C, and 6 months after opening the tubes. The field assessment of the LAMP kit in Ninh Binh province showed a *C. sinensis* rate of 6.66%, which was similar to the rate obtained from the studies using the real-time PCR method. **Conclusions:** The research has successfully produced a LAMP kit for the diagnosis of *C. sinensis* that is sensitive >95% and highly specific >95%. The LAMP kit is stable within 12 months at -20±5°C and for 6 months after opening the tubes.

Keywords: *Clonorchis sinensis*, LAMP kit, real-time PCR.

Classification number: 3.3

Ký sinh trùng - Côn trùng Trung ương và xã Yên Lộc, huyện Kim Sơn, tỉnh Ninh Bình.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu mô tả thực nghiệm phòng thí nghiệm và đánh giá kit LAMP tại thực địa hẹp tỉnh Ninh Bình.

2.2.2. Cỡ mẫu nghiên cứu

- Đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu tại phòng thí nghiệm: 100 mẫu phân có kết quả xét nghiệm bằng real-time PCR, trong đó có 73 mẫu dương tính và 27 mẫu âm tính với sán lá gan nhỏ *C. sinensis*. Các mẫu phân được thu từ người dân sống tại Ninh Bình.

- Đánh giá bộ kit tại thực địa hẹp tại Ninh Bình: 150 mẫu.

2.2.3. Nội dung nghiên cứu

- Thiết kế bộ môi LAMP: Môi LAMP được thiết kế trên vùng gen ty thể nad1 bằng phần mềm Primer Explorer v.5 (<https://primerexplorer.jp/e/>). Đánh giá tính đặc hiệu của môi bằng Blast Primer trên Ngân hàng gen NCBI và thực nghiệm bằng kỹ thuật PCR sử dụng cặp môi ngoài F3/B3 trên các mẫu sán lá gan nhỏ trưởng thành, mẫu phân và một số loài sán, giun khác.

- Khảo sát tối ưu hóa các thông số của phản ứng LAMP: Nhiệt độ hoạt động của bộ môi (59-68°C); nồng độ Mg²⁺ (2, 4, 6 và 8 mM); thời gian của phản ứng, dye màu phát hiện sản phẩm LAMP bằng hydroxyl naphthol blue (HNB) thêm vào hỗn hợp dung dịch trước phản ứng. Các nồng độ HNB được khảo sát là 80, 100, 120 và 140 μM.

- Ngưỡng phát hiện của kit LAMP được xác định bằng cách thử nghiệm phản ứng LAMP trên dãy nồng độ pha loãng bậc 10 liên tiếp với mẫu DNA plasmid tái tổ hợp mang đoạn gen nad1 đặc trưng của sán lá gan nhỏ đã biết nồng độ.

- Đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu, độ ổn định của bộ kit tại phòng thí nghiệm.

- Đánh giá bộ kit LAMP tại thực địa tỉnh Ninh Bình.

2.2.4. Hóa chất, vật liệu tiêu hao

- Hóa chất: Kit tách chiết DNA từ mẫu mô, mẫu phân của Hãng Qiagen, Đức. Enzyme Bst DNA polymerase large fragment của Hãng New England Biolabs, Mỹ; dNTPs mix của Hãng Qiagen và Thermo Fisher Scientific. Các trình tự môi thiết kế được đặt tổng hợp bởi Hãng IDT, Mỹ...

- Vật liệu tiêu hao: ống nhựa 2 ml, ống PCR 0,2 ml, đầu tip phin lọc 1 ml, 200 μl, 100 μl và 10 μl.

2.2.5. Các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu

- Thiết kế môi sử dụng các phần mềm tin sinh chuyên dụng như Bioedit V.7.2.6.1, Primer Explorer v.5, Primer Blast...

- Kỹ thuật real-time PCR xác định sán lá gan nhỏ theo X.Q. Cai và cs (2012) [5].

- Kỹ thuật phản ứng PCR, LAMP.

- Xử lý thống kê bằng phần mềm MedCalc 19.4.1.

2.2.6. Đạo đức trong nghiên cứu

Hồ sơ nghiên cứu được Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu y sinh của Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng Trung ương thông qua tại Quyết định số 87/QĐ-VSR ngày 9/1/2017.

3. Kết quả

3.1. Thiết kế, đánh giá lựa chọn các bộ môi LAMP

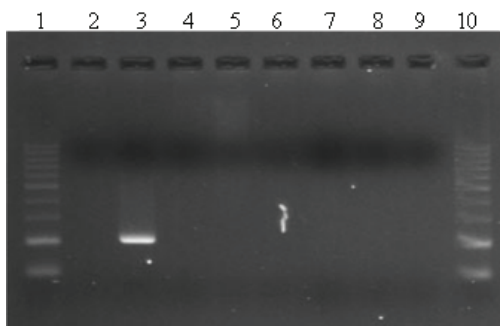
Bộ môi được thiết kế dựa trên gen ty thể nad1 mã số MF287784.1 của chủng *C. sinensis* công bố trên Ngân hàng gen NCBI với các chủng lưu hành ở Việt Nam, Trung Quốc và Hàn Quốc. Môi được lựa chọn đáp ứng các yêu cầu kỹ thuật như về độ dài đoạn khuếch đại là 188 bp, tính bền vững ở đầu các môi như đầu 3' của các môi F3/B3, F2/B2 và đầu 5' của F1c/B1c với năng lượng tự do $\Delta G \leq -4$ kcal/mol, thành phần GC trong môi chiếm 40-65%... Bộ môi thiết kế có trình tự được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Trình tự môi LAMP thiết kế để chẩn đoán sán lá gan nhỏ *C. sinensis*.

Thứ tự	Tên môi	Trình tự môi	Chiều dài môi (bp)
1	HCS-nad1-F3	GTTCAGTGACGCTTTTG TG	19
2	HCS-nad1-B3	GTAATCACCACACCAAAAG	20
3	HCS-nad1-FIP (F1c+F2)	TATACGACCCCAACCAACC- GTTGCTTTTAATTACTAGGTGAC	48
4	HCS-nad1-BIP (B1c+B2)	AAGTTTGCTCTTATAAGTTGTGTC- AATGCACATAAAACAGGCC	48

Khi Blast trình tự primer trên Ngân hàng gen NCBI chỉ bắt cặp đặc hiệu với các trình tự gen đích nad1 của *C. sinensis*, không lai chéo với các loài khác.

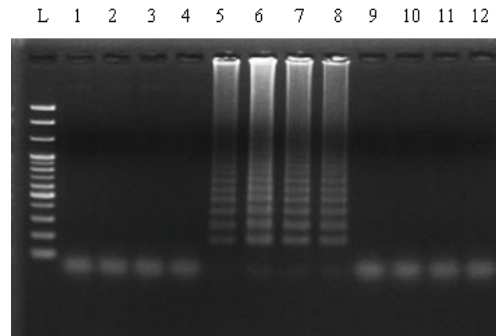
Kết quả khảo sát độ đặc hiệu thực nghiệm bằng phản ứng PCR sử dụng cặp môi F3/B3 của bộ môi LAMP với nền mẫu DNA tách chiết từ mẫu phân nhiễm trứng sán lá gan nhỏ và 8 mẫu DNA tách từ các loài sán, giun khác chỉ cho sản phẩm PCR với kích thước band điện di thu được là 188 bp với sán lá gan nhỏ *C. sinensis* đúng với kích thước thiết kế, không lai chéo với các loài sán, giun thử nghiệm khác.



Hình 1. Ảnh điện di sản phẩm PCR sử dụng cặp môi F3/B3 của *C. sinensis*. Giếng 1 và 10: ladder 100 bp; giếng 2: *O. viverrini*; giếng 3: *C. sinensis*; giếng 4: *H. pumilio*; giếng 5: *H. taichui*; giếng 6: *E. japonicas*; giếng 7: *F. gigantica*; giếng 8: *A. lumbricoide*; giếng 9: chứng âm.

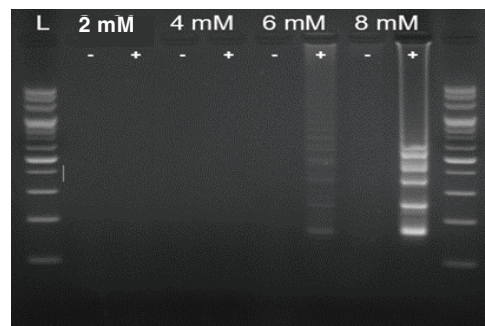
3.2. Kết quả khảo sát và tối ưu hóa phản ứng LAMP

Nhiệt độ bắt cặp môi LAMP: Kết quả khảo sát lựa chọn nhiệt độ ủ môi tiến hành cho phản ứng LAMP chẩn đoán sán lá gan nhỏ *C. sinensis* là 63°C (hình 2).



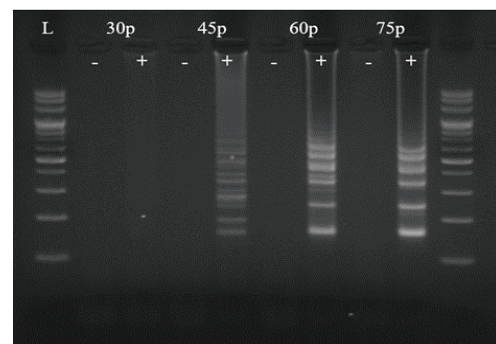
Hình 2. Ảnh điện di sản phẩm LAMP khảo sát nhiệt độ ủ môi ở dải nhiệt độ 59-68°C. L: thang đo 100 bp; giếng 1: chứng âm; giếng 2-12: khảo sát nhiệt độ ủ môi ở 59-68°C; giếng 6: nhiệt độ ủ môi 63°C.

Nồng độ $MgSO_4$ 8 mM cho sản phẩm LAMP tối ưu với hiệu suất tổng hợp cao hơn được lựa chọn sử dụng cho phản ứng LAMP (hình 3).



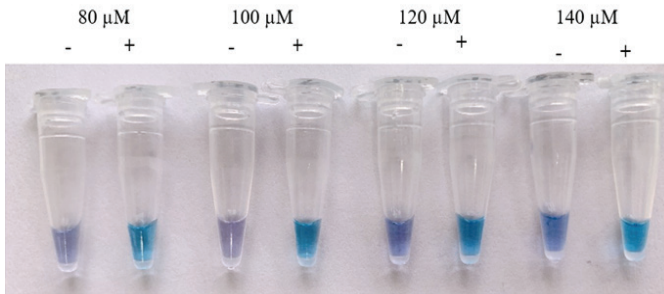
Hình 3. Ảnh điện di sản phẩm LAMP khảo sát với các nồng độ $MgSO_4$. L: thang đo 100 bp; (-): chứng âm; (+): DNA khuôn nồng độ 10^{-3} ng/μl.

Thời gian thực hiện phản ứng LAMP cho sản phẩm tổng hợp với hiệu suất tổng hợp cao, ổn định là 60 hoặc 75 phút (hình 4). Trong nghiên cứu này, chúng tôi lựa chọn thời gian tối ưu cho phản ứng LAMP là 60 phút.



Hình 4. Ảnh điện di sản phẩm LAMP khảo sát thời gian thực hiện phản ứng. L: thang đo 100 bp; (-): chứng âm là nước khử ion; (+): DNA khuôn nồng độ 10^{-3} ng/μl.

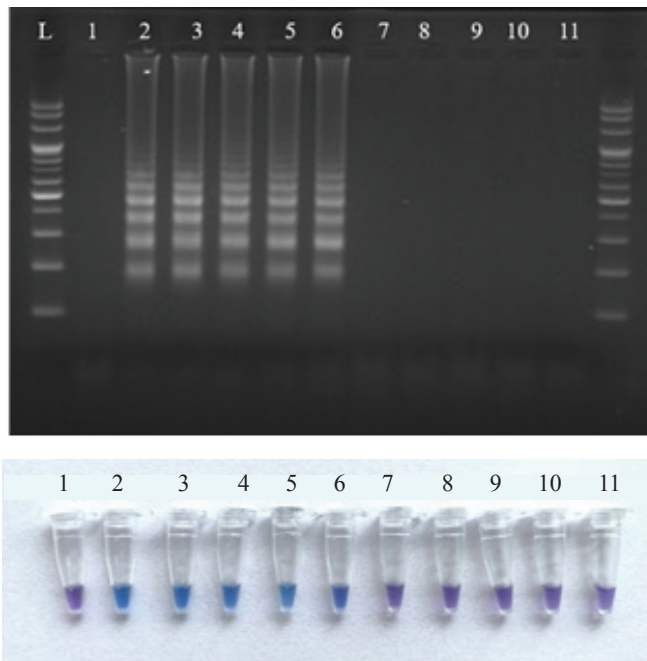
Khảo sát chất chỉ thị màu sử dụng để phát hiện sản phẩm LAMP bằng mắt thường: Kết quả thực nghiệm cho thấy, cả 4 nồng độ chất chỉ thị màu HNB đều có thể phát hiện, phân biệt rõ ràng giữa mẫu âm tính và dương tính bằng mắt thường. Nồng độ 100 μ M được chọn là nồng độ tối ưu được thêm vào phản ứng LAMP (hình 5).



Hình 5. Ảnh sản phẩm LAMP được phát hiện bằng chất chỉ thị màu HNB với các nồng độ. "-": âm tính; "+": dương tính.

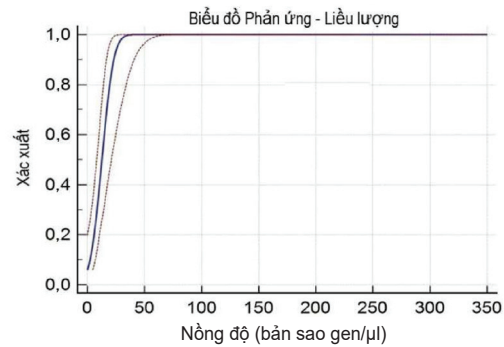
3.3. Kết quả xác định ngưỡng phát hiện của bộ kit LAMP

Ngưỡng phát hiện sơ cấp của bộ kit LAMP chẩn đoán *C. sinensis* là 10^{-7} ng/ μ l. Đây là ngưỡng thấp nhất cả 3 lần thử nghiệm đều cho kết quả dương tính (hình 6).



Hình 6. Kết quả khảo sát ngưỡng phát hiện của kỹ thuật LAMP dựa trên dãy nồng độ pha loãng của chứng dương chuẩn là plasmid tái tổ hợp. L: thang đo 100 bp; giếng 1: chứng âm; giếng 2: nồng độ DNA 10^{-3} ng/ μ l; giếng 3: nồng độ DNA 10^{-4} ng/ μ l; giếng 4: nồng độ DNA 10^{-5} ng/ μ l; giếng 5: nồng độ DNA 10^{-6} ng/ μ l; giếng 6: nồng độ DNA 10^{-7} ng/ μ l; giếng 7: nồng độ DNA 5×10^{-8} ng/ μ l; giếng 8: nồng độ DNA $2,5 \times 10^{-8}$ ng/ μ l; giếng 9: nồng độ DNA 10^{-8} ng/ μ l; giếng 10: nồng độ DNA 10^{-9} ng/ μ l; giếng 11: nồng độ DNA 10^{-10} ng/ μ l.

Kết quả sử dụng phần mềm MedCalc 19.4.1 để phân tích xác định ngưỡng phát hiện của kit LAMP được thể hiện ở hình 7.



Hình 7. Biểu đồ xác định ngưỡng phát hiện của kit LAMP chẩn đoán sán lá gan nhỏ *C. sinensis*.

Kết quả phân tích xác định ngưỡng phát hiện LOD 95% của kit LAMP chẩn đoán sán lá gan nhỏ *C. sinensis* là $2,66 \times 10^1$ bản sao gen/ μ l (95% CI: $2,05 \times 10^1$ đến $4,15 \times 10^1$ bản sao gen/ μ l).

3.4. Kết quả đánh giá bộ kit LAMP tại phòng thí nghiệm và thực địa

Kết quả bảng 2 cho thấy, độ nhạy của kit LAMP chẩn đoán *C. sinensis* tại phòng thí nghiệm là 98,63% (95% CI: 91,92-99,99), độ đặc hiệu là 100% (95% CI: 85,25-100%).

Bảng 2. Độ nhạy, độ đặc hiệu của kit LAMP chẩn đoán sán lá gan nhỏ *C. sinensis*.

Kit LAMP	Kỹ thuật real-time PCR	
	Dương tính	Âm tính
Dương tính	72	0
Âm tính	1	27
Tổng	73	27
	Độ nhạy là 98,63% (95% CI: 91,92-99,99%)	Độ đặc hiệu là 100% (95% CI: 85,25-100%)

Tổng số 150 mẫu DNA tách từ mẫu phân bằng bộ QIAamp DNA Stool mini Kit được xét nghiệm bằng kỹ thuật LAMP tại thực địa tỉnh Ninh Bình và real-time PCR tại phòng thí nghiệm kết quả xác định có 10/150 (6,66%) mẫu dương tính và 140/150 (93,34%) mẫu âm tính với sán lá gan nhỏ *C. sinensis*, tỷ lệ tương đồng kết quả là 100% (bảng 3).

Bảng 3. Kết quả xét nghiệm phát hiện sán lá gan nhỏ *C. sinensis* bằng bộ kit LAMP tại thực địa tỉnh Ninh Bình và so sánh với xét nghiệm real-time PCR.

Kit LAMP	Kỹ thuật real-time PCR		
	Dương tính	Âm tính	Tổng
Dương tính	10	0	10
Âm tính	0	140	140
Tổng	10	140	150
Kapa: 1,0			

4. Bàn luận

4.1. Thiết kế lựa chọn môi LAMP

Bộ môi LAMP được thiết kế dựa trên cơ sở dữ liệu bộ gen của sán lá gan nhỏ *C. sinensis* trên Ngân hàng gen NCBI, sử dụng phần mềm như Bioedit V.7.2.6.1, để tìm vùng bảo tồn trên vùng gen mục tiêu. Có 24 trình tự gen nad1 của các chủng *C. sinensis* có nguồn gốc từ Việt Nam, Trung Quốc và Hàn Quốc được lựa chọn để thiết kế môi, kết quả phân tích đã lựa chọn được vùng bảo thủ có chiều dài 309 bp. Sử dụng phần mềm trực tuyến Primer Explorer v.5 để thiết kế môi, lựa chọn môi dựa trên các tiêu chí kỹ thuật của yêu cầu thiết kế môi về mặt lý thuyết theo hướng dẫn [1]. Bộ môi HCS-nad1 được lựa chọn do đáp ứng các yêu cầu kỹ thuật về mặt kích thước chiều dài môi F3/B3 là 188 bp, về tỷ lệ phần trăm GC nằm trong khoảng 45-65% và mức năng lượng tự do ở các đầu 3' của các môi thiết kế có ΔG từ -4,01 đến -6,73 < -4 kcal/mol. Hơn nữa, khi Blast các trình tự môi trên Ngân hàng gen NCBI để kiểm tra độ đặc hiệu lý thuyết cho thấy, môi thiết kế bắt cặp đặc hiệu với các trình tự gen nad1 của các chủng *C. sinensis* được công bố trên Ngân hàng gen NCBI với tỷ lệ 100%, không lai chéo với các loài sán lá gan nhỏ khác và cũng không có sự lai chéo với các trình tự DNA các loài giun khác. Kết quả kiểm tra độ đặc hiệu bằng thực nghiệm cho thấy, cặp môi F3/B3 của bộ môi LAMP thiết kế chỉ cho sản phẩm PCR đặc hiệu với mẫu DNA của sán lá gan nhỏ *C. sinensis*, kích thước sản phẩm PCR thu được đúng với kích thước thiết kế là 188 bp, không có lai chéo với các loài giun, sán khác (hình 1).

4.2. Tối ưu thành phần và điều kiện của phản ứng LAMP, xác định ngưỡng phát hiện của kit LAMP

Một trong những đặc trưng của LAMP là khuếch đại DNA ở điều kiện đẳng nhiệt có thể dao động 50-68°C. Nhiệt độ ủ môi theo lý thuyết là nhiệt độ tham khảo, trong khi nhiệt độ bắt cặp thực tế có thể cao hơn 3-12°C [1]. Trên cơ sở này, chúng tôi đã khảo sát nhiệt độ ủ môi trong khoảng 59-68°C. Kết quả khảo sát bộ môi HCS-nad1 cho thấy, ở nhiệt độ 63°C cho sản phẩm khuếch đại đạt hiệu suất cao nhất (hình 2). Điểm nhiệt độ này cao hơn nhiệt độ nóng chảy (T_m) của bộ môi thiết kế ở 5-7°C phù hợp với nhiệt độ lai theo lý thuyết, đây cũng là nhiệt độ phù hợp cho hoạt tính xúc tác của enzyme Bst DNA Polymerase theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

Thời gian ủ của phản ứng LAMP được khảo sát với các mốc thời gian là 30, 45, 60 và 75 phút. Kết quả cho thấy, phản ứng LAMP cho sản phẩm nhân bản DNA ở mốc thời gian là 45, 60 và 75 phút (hình 4). Trong đó, ở mốc thời gian 45 phút do chưa đủ thời gian cho phản ứng tổng hợp nên lượng sản phẩm thu được còn ít, ở mốc 60 và 75 phút lượng sản phẩm tổng hợp được cao hơn, các band điện di thu được rõ ràng. Với mục tiêu giảm thời gian xét nghiệm nên chúng tôi lựa chọn thời gian ủ 60 phút để phát triển các bộ kit LAMP. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của S.M.M. Rahman và cs (2017) [6] khi lựa chọn thiết kế bộ môi dựa

trên gen đích Cox1 của bộ gen ty thể phát hiện *C. sinensis* với thời gian phản ứng là 60 phút; một số tác giả khác lựa chọn thời gian lâu hơn như T.H. Le và cs (2012) [7] là 75 phút hoặc ít hơn như Y. Arimatsu và cs (2015) [8] phát triển kỹ thuật LAMP xác định sán lá gan lớn *Fasciola* với thời gian ủ phản ứng là 45 phút.

Nồng độ $MgSO_4$ là yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả và tính đặc hiệu của phản ứng LAMP. Trong dung dịch đệm quan trọng nhất là ion Mg^{2+} làm tăng nhiệt độ nóng chảy của DNA mạch đôi, tạo ra phức chất tan với dNTPs để hình thành cơ chất mà enzym polymerase có thể nhận ra, điều này rất cần thiết cho quá trình liên kết của các dNTPs. Nồng độ $MgSO_4$ trong phản ứng thấp làm giảm hiệu quả nhân bản thậm chí không thể nhân bản được. Ở nồng độ cao, $MgSO_4$ ức chế phản ứng LAMP hoặc giảm tính đặc hiệu của môi do nó ổn định cấu trúc bắt cặp không đặc hiệu và tạo ra sản phẩm ký sinh. Trong phản ứng LAMP, nồng độ $MgSO_4$ thích hợp thường nằm trong khoảng 4 đến 10 mM. Sau khảo sát, chúng tôi nhận thấy rằng, $MgSO_4$ ở nồng độ 4 mM không có sản phẩm khuếch đại; $MgSO_4$ ở nồng độ 6 mM cho sản phẩm không ổn định, hiệu suất không cao; $MgSO_4$ ở nồng độ 8 mM cho sản phẩm LAMP với hiệu suất khuếch đại cao và ổn định. Do vậy, nồng độ $MgSO_4$ 8 mM được lựa chọn là nồng độ tối ưu cho phản ứng LAMP chẩn đoán sán lá gan nhỏ *C. sinensis*. Kết quả này cũng tương đồng với nghiên cứu của T.H. Le và cs (2012) [7], S.M.M. Rahman và cs (2017) [6] và cũng nằm trong khoảng nồng độ $MgSO_4$ tối ưu theo khuyến cáo của nhà sản xuất enzyme Bst DNA polymerase.

Để phát hiện sản phẩm của phản ứng LAMP bằng mắt thường có nhiều phương pháp như phát hiện sản phẩm khuếch đại trực quan bằng cách quan sát độ đục của dung dịch, bằng thuốc nhuộm huỳnh quang hoặc thuốc nhuộm chỉ thị pH, mỗi cách thức lại có những ưu và nhược điểm riêng. Gần đây, một số chất chỉ thị màu được sử dụng thêm vào phản ứng LAMP là các chỉ thị nhạy với pH như là HNB [9]. HNB hiệu quả khi các chất chỉ thị này được bổ sung vào đệm LAMP trước khi tiến hành phản ứng và không ảnh hưởng đến hoạt động của enzyme Bst DNA polymerase, đồng thời loại bỏ nguy cơ tạp nhiễm giữa các mẫu. Trong quá trình phản ứng LAMP xảy ra, ban đầu nồng độ Mg^{2+} cao và có 1,4 mM dNTPs thì HNB cho màu tím than. Sau đó lượng Mg^{2+} giảm dần do tham gia phản ứng kết tủa với một sản phẩm phụ của phản ứng LAMP (pyrophosphate) và dẫn đến dung dịch phản ứng LAMP chuyển dần sang màu xanh da trời. Với nghiên cứu này, nồng độ HNB 100 μM là tối ưu có thể phân biệt được các mẫu dương tính và âm tính.

Theo T. Notomi và cs (2000) [10], giới hạn phát hiện của kỹ thuật LAMP có thể tương đương với kỹ thuật PCR. Nghiên cứu trước đây của T.H. Le và cs (2012) [7] cho kết quả ngưỡng phát hiện của kỹ thuật LAMP là từ 10^{-3} (1 pg) đến 10^{-4} ng (100 fg) với nền mẫu DNA tách từ sán lá gan nhỏ trưởng thành, trong khi với xét nghiệm PCR thông thường là 10^{-2} ng (10 pg). Điều này cho thấy, LAMP nhạy hơn khoảng 100 lần so với xét nghiệm PCR thông thường. Trong nghiên cứu này, ngưỡng phát hiện của kỹ

thuật LAMP xác định sán lá gan nhỏ được xác định bằng phản ứng LAMP với nền mẫu là dây nồng độ DNA pha loãng từ plasmid tái tổ hợp mang đoạn gen nad1 đặc trưng của sán lá gan nhỏ *C. sinensis*. Kết quả khảo sát xác định ngưỡng phát hiện (LOD 95%) của bộ kit LAMP chẩn đoán sán lá gan nhỏ *C. sinensis* là $2,66 \times 10^1$ số bản sao gen/μl (95% CI: $2,05 \times 10^1$ đến $4,15 \times 10^1$ bản sao gen/μl) (hình 7). Với ngưỡng phát hiện đạt $2,66 \times 10^1$ bản sao gen/μl tương đương với ngưỡng phát hiện của một số bộ kit đã được công bố và thương mại trên thị trường như kit LAMP xác định ký sinh trùng sốt rét của Công ty Eiken, Nhật Bản với ngưỡng phát hiện 10-100 bản sao gen/μl [11].

4.3. Độ nhạy, độ đặc hiệu của bộ kit LAMP và kết quả đánh giá tại thực địa

Đến nay còn có rất ít các nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật LAMP phát hiện sán lá gan nhỏ *C. sinensis* trên người. Một số nhà khoa học đã phát triển ứng dụng kỹ thuật LAMP phát hiện sán lá gan nhỏ *C. sinensis* trên vật chủ trung gian cá nước ngọt, ốc. Kết quả xác định LAMP không có sự nhiễu chéo với các loài khác, độ nhạy của LAMP cao hơn 1000 lần so với PCR thông thường, giới hạn phát hiện khoảng 10 fg [9]. S.M.M. Rahman và cs (2017) [6] nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật LAMP sử dụng gen CoxI phát hiện sán lá gan nhỏ *C. sinensis* trên mẫu phân người, giới hạn phát hiện của kỹ thuật khoảng 100 fg, với khoảng 1 trứng/100 mg phân, độ nhạy với mẫu 100 trứng/g phân đạt được 100%. Nghiên cứu của chúng tôi đánh giá trên 100 mẫu phân để xét nghiệm đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu tham chiếu với kết quả xét nghiệm bằng real-time PCR. Kết quả đã xác định được độ nhạy của kit LAMP chẩn đoán *C. sinensis* do chúng tôi phát triển tại phòng thí nghiệm là 98,63% (95% CI: 91,92-99,99%), độ đặc hiệu là 100% (95% CI: 85,25-100%). Độ nhạy, độ đặc hiệu này cũng tương đồng với độ nhạy của kỹ thuật LAMP phát hiện sán lá gan nhỏ *C. sinensis* của S.M.M. Rahman và cs (2017) [6] với độ nhạy đạt 97,1% và độ đặc hiệu là 100%. Bộ kit LAMP được theo dõi đánh giá độ ổn định trong vòng 1 năm, kết quả cho thấy, bộ kit hoạt động ổn định sau 6 tháng mở nắp sử dụng và 1 năm kể từ ngày sản xuất khi chưa mở nắp. Với độ ổn định của bộ kit trong 1 năm sử dụng khi được bảo quản ở $-20 \pm 5^\circ\text{C}$ là tương đối phù hợp cho triển khai xét nghiệm ở các cơ sở y tế tuyến dưới. Kết quả thử nghiệm đánh giá bộ kit LAMP tại xã Yên Lộc, huyện Kim Sơn, tỉnh Ninh Bình bước đầu cho thấy đã phát hiện được tỷ lệ nhiễm sán lá gan nhỏ *C. sinensis* là 6,66%, kết quả này tương đương với xét nghiệm bằng real-time PCR tại phòng thí nghiệm.

5. Kết luận

Chế tạo được bộ kit LAMP chẩn đoán sán lá gan nhỏ *C. sinensis* có độ nhạy, độ đặc hiệu cao $>95\%$, độ ổn định của kit là 12 tháng trong điều kiện bảo quản $-20 \pm 5^\circ\text{C}$ và 6 tháng kể từ ngày mở nắp sản phẩm. Từ kết quả này có thể tiếp tục nghiên cứu đánh giá mở rộng và hoàn thiện bộ kit thành bộ sinh phẩm chẩn đoán sán lá gan nhỏ *C. sinensis* trên người.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] V. Bouvard, R. Baan, K. Straif, et al. (2009), "A review of human carcinogens - part B: Biological agents", *Lancet Oncol.*, **10**(4), pp.321-322, DOI: 10.1016/s1470-2045(09)70096-8.
- [2] National Institute of Malariology Parasitology and Entomology (2019), *Report Summarizing The Prevention of Malaria, Parasites and Insects in 2019 and Implementing The Plan for 2020* (in Vietnamese).
- [3] World Health Organisation (2019), *Bench Aids for The Diagnosis of Intestinal Parasites*, Second Edition, 32pp.
- [4] K. Duenngai, P. Sithithaworn, U.K. Rudrappa, et al. (2008), "Improvement of PCR for detection of *Opisthorchis viverrini* DNA in human stool samples", *J. Clin. Microbiol.*, **46**(1), pp.366-368, DOI: 10.1128/JCM.01323-07.
- [5] X.Q. Cai, H.Q. Yu, J.S. Bai, et al. (2012), "Development of a TaqMan based real-time PCR assay for detection of *Clonorchis sinensis* DNA in human stool samples and fishes", *Parasitol. Int.*, **61**(1), pp.183-186, DOI: 10.1016/j.parint.2011.06.010.
- [6] S.M.M. Rahman, H.B. Song, Y. Jin, et al. (2017), "Application of a Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay targeting cox1 gene for the detection of *Clonorchis sinensis* in human fecal samples", *PLOS Neglected Tropical Diseases*, **11**(10), DOI: 10.1371/journal.pntd.0005995.
- [7] T.H. Le, N.T.B. Nguyen, N.H. Truong, et al. (2012), "Development of mitochondrial Loop-mediated isothermal amplification for detection of the small liver fluke *Opisthorchis viverrini* (Opisthorchiidae, Trematoda, Platyhelminthes)", *J. Clin. Microbiol.*, **50**(4), pp.1178-1184, DOI: 10.1128/JCM.06277-11.
- [8] Y. Arimatsu, S. Kaewkes, T. Laha, et al. (2015), "Specific diagnosis of *Opisthorchis viverrini* using Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) targeting parasite microsatellites", *Acta Trop.*, **141**, Pt. B, pp.368-371, DOI: 10.1016/j.actatropica.2014.09.012.
- [9] M. Goto, E. Honda, A. Ogura, et al. (2009), "Colorimetric detection of Loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue", *Biotechniques*, **46**(3), pp.167-172, DOI: 10.2144/000113072.
- [10] T. Notomi, H. Okayama, H. Masubuchi, et al. (2000), "Loop-mediated isothermal amplification of DNA", *Nucleic Acids Res.*, **28**(12), DOI: 10.1093/nar/28.12.e63.
- [11] Eiken Chemical Co. Ltd (2012), *Manual of Standard Operating Procedures for Malaria LAMP*, 30pp.

Đánh giá tác dụng giảm đau của cao đặc chiết xuất từ Bìm bịp, Ngũ trảo, Thanh táo và Lá lốt trên thực nghiệm

Nguyễn Thị Phương Thủy*, Hứa Hoàng Oanh

Khoa Y học Cổ truyền, Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh, 221B Hoàng Văn Thụ, phường 8, quận Phú Nhuận, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài 3/10/2022; ngày chuyển phản biện 6/10/2022; ngày nhận phản biện 27/10/2022; ngày chấp nhận đăng 31/10/2022

Tóm tắt:

Mục tiêu: Khảo sát tác dụng giảm đau của cao đặc chiết xuất từ Bìm bịp, Ngũ trảo, Thanh táo và Lá lốt (cao BNTL) trên chuột nhắt trắng. **Nghiên cứu** bước đầu cung cấp cơ sở khoa học làm tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo về tác dụng của bài thuốc có nguồn gốc tự nhiên được dùng tại chỗ. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Chuột nhắt trắng, chủng *Swiss albino*, trọng lượng 20 ± 2 g, cung cấp bởi Viện Pasteur TP Hồ Chí Minh; đánh giá tác dụng giảm đau của cao BNTL trên 2 mô hình thực nghiệm là phương pháp mâm nóng và gây đau cơ học. **Kết quả:** Cao BNTL dùng tại chỗ có tác dụng kéo dài thời gian xuất hiện phản ứng đau với tác nhân cơ học có ý nghĩa thống kê so với lô chứng. Cao BNTL giúp kéo dài thời gian xuất hiện phản ứng với nhiệt độ của chuột nhắt trắng, nhưng không có ý nghĩa thống kê so với lô chứng trong mô hình mâm nóng. **Kết luận:** Cao BNTL không thể hiện tác dụng giảm đau trung ương, nhưng có thể hiện tác dụng giảm đau trong mô hình gây đau cơ học thực nghiệm.

Từ khoá: Bìm bịp, giảm đau, Lá lốt, mô hình gây đau cơ học, mô hình mâm nóng, Ngũ trảo, Thanh táo.

Chỉ số phân loại: 3.4

1. Đặt vấn đề

Cao BNTL được chiết xuất từ hỗn hợp các dược liệu Bìm bịp (*Clinacanthus nutans* (Burm. f.) Lindau), Ngũ trảo (*Vitex negundo* L.), Thanh táo (*Justicia gendarussa* L.) và Lá lốt (*Piper lolot* L.). Cao BNTL có nguồn gốc từ bài thuốc dân gian [1], một bài thuốc được người dân sử dụng nhiều để đắp ngoài nhằm điều trị bong gân, viêm khớp, giúp giảm đau, kháng viêm. Trong các bệnh lý cơ xương khớp, triệu chứng viêm và đau thường đi cùng với nhau. Bìm bịp đã được chứng minh có tác dụng kháng viêm, làm lành vết thương [2]; Ngũ trảo, Thanh táo, Lá lốt có tác dụng kháng viêm, giảm đau [3-5]. Câu hỏi đặt ra là việc kết hợp các vị thuốc trên như dân gian vẫn thường dùng có tác dụng giảm đau hay không?

Xuất phát từ thực tiễn nêu trên, nghiên cứu “Đánh giá tác dụng giảm đau của cao đặc chiết xuất từ BNTL trên thực nghiệm” được thực hiện để trả lời câu hỏi trên và góp phần làm cơ sở cho các nghiên cứu ứng dụng cao BNTL trong điều trị các bệnh lý cơ xương khớp.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

Cao BNTL được chiết xuất bằng phương pháp ngâm kiệt với dung môi ethanol 70% từ hỗn hợp các dược liệu

BNTL với tỷ lệ 1:1:1:1. Các dược liệu khô được cung cấp bởi Bệnh viện Y học Cổ truyền TP Hồ Chí Minh và đạt tiêu chuẩn cơ sở.

Cao BNTL được cô đến cao đặc (mất khối lượng do làm khô là 18,1%), hiệu suất chiết thu được là 11,1%.

Động vật nghiên cứu: Chuột nhắt trắng, chủng *Swiss albino*, khỏe mạnh, cả 2 phái, 5-6 tuần tuổi, khối lượng trung bình 20 ± 2 g, được cung cấp bởi Viện Pasteur TP Hồ Chí Minh và được ổn định ít nhất 1 tuần trước khi thử nghiệm. Chuột được nuôi dưỡng ổn định trong điều kiện nhiệt độ 25-28°C, chế độ chiếu sáng tự nhiên tại Phòng Thí nghiệm Y Dược Cổ truyền, Khoa Y học Cổ truyền, Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh.

Thuốc đối chiếu: Voltaren Emulgel (GSK, lô sản xuất RD4H-A, hạn sử dụng tháng 7/2023). Hoạt chất: Diclofenac diethylamine 1,16%.

Salonpas gel (Hisamitsu, lô sản xuất 3971, hạn sử dụng tháng 3/2026). Hoạt chất: Methyl salicylate 15%, 1 - Menthol 7%.

Trang thiết bị: Mâm nóng (model 35100-001, Ugo - Basile, Ý); dụng cụ gây đau cơ học (model 37215, Ugo - Basile, Ý); cân phân tích 4 số lẻ (Mettler AE, Đức), cân điện tử 2 số lẻ (Tanita KD 420); băng keo lụa Urgo Strong Adhesive Tape.

*Tác giả liên hệ: Email: ntpthuy@ump.edu.vn

Analgesic effects of semi-solid extract from four medicinal herbs (*Clinacanthus nutans* (Burm. f.) Lindau, *Vitex negundo* L., *Justicia gendarussa* L., *Piper lolot* L.) in mice

Thi Phuong Thuy Nguyen*, Hoang Oanh Hua

Faculty of Traditional Medicine,
University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh City, 221B Hoang Van Thu Street,
Ward 8, Phu Nhuan District, Ho Chi Minh City, Vietnam

Received 3 October 2022; revised 27 October 2022; accepted 31 October 2022

Abstract:

Objectives: This study was conducted with the aim of evaluating the experimental analgesic effects of the semi-solid extract from four folk medicinal herbs: *Clinacanthus nutans* (Burm. f.) Lindau, *Vitex negundo* L., *Justicia gendarussa* L., and *Piper lolot* L. (BNTL extract). This study provides a scientific basis for further research on the effects of a topically applied natural-origin remedy. **Materials and methods:** Swiss albino mice, 20±2 g in weight, provided by the Pasteur Institute in Ho Chi Minh city. Hot-plate method and mechanical pain method were used to determine the analgesic effects of BNTL extract. **Results:** BNTL extract applied topically showed only a statistically significant effect on prolonging the response time compared with the control group to mechanical agents. BNTL extract helps prolong the time to appear temperature response in white mice, but has no statistical significance compared to the control group in the hot plate model. **Conclusions:** BNTL extract did not show central analgesic effects, but did show analgesic effects in experimental mechanical pain models.

Keywords: analgesic effect, *Clinacanthus nutans* (Burm. f.) Lindau, hot-plate method, *Justicia gendarussa* L., mechanical pain method, *Piper lolot* L., *Vitex negundo* L..

Classification number: 3.4

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Xây dựng một số tiêu chuẩn kiểm nghiệm sơ bộ cao Bìm bịp, Ngũ trảo, Thanh táo và Lá lốt

- Hình thức: Trãi 2 g chế phẩm lên mặt kính đồng hồ, quan sát bằng mắt thường.

- Mất khối lượng do làm khô (Phụ lục 9.6, Dược điển Việt Nam V): dùng 1 g cao BNTL [6].

- Xác định tro toàn phần (Phụ lục 9.8, Dược điển Việt Nam V): dùng 1 g cao BNTL [6].

- Định tính sơ bộ các hợp chất tự nhiên trong cao BNTL: Cao BNTL được chiết xuất trong các dung môi thích hợp để thực hiện phản ứng định tính sơ bộ một số nhóm hoạt chất bằng các phản ứng hóa học đặc trưng theo bảng 1 [7].

Bảng 1. Phương pháp phân tích các nhóm hợp chất có trong cao chiết.

Nhóm hợp chất	Thuốc thử/cách thực hiện	Phản ứng dương tính
Tinh dầu	Bốc hơi tới cạn	Có mùi thơm
Alkaloid	Thuốc thử chung alkaloid	Kết tủa
Coumarin	Phát quang trong kiềm	Phát quang mạnh hơn
Anthraquinon	KOH 10%	Dung dịch có màu hồng tới đỏ
Flavonoid	Mg/HCl đậm đặc	Dung dịch có màu hồng tới đỏ
Polyphenol	Thuốc thử Folin-Ciocalteu	Phức màu xanh
Tannin	FeCl ₃	Xanh rêu hay xanh đen (polyphenol)
	Dung dịch gelatin muối	Tủa bông trắng (tannin)
Saponin	Lắc mạnh với nước	Tạo bọt
	Thuốc thử Liebermann	Có vòng tím nâu
Acid hữu cơ	Bột Na ₂ CO ₃	Sủi bọt

Kết quả phân tích được đánh giá theo các mức sau: (-): không có, (±): không rõ, (+): có ít, (++) : có nhiều, (+++): có rất nhiều.

2.2.2. Đánh giá tác dụng giảm đau của cao Bìm bịp, Ngũ trảo, Thanh táo và Lá lốt bằng mô hình mâm nóng [8-10]

Chuột nhắt trắng được chia ngẫu nhiên thành 4 lô, mỗi lô 10 con:

- Lô 1 (chứng sinh học): Không bôi gì vào 2 chân chuột.

- Lô 2 (Salonpas): Bôi Salonpas gel vào toàn bộ 2 gan bàn chân chuột (0,2 g thuốc/chân).

- Lô 3 (Voltaren): Bôi Voltaren Emulgel vào toàn bộ 2 gan bàn chân chuột (0,2 g thuốc/chân).

- Lô 4 (cao BNTL): Bôi cao thuốc vào toàn bộ 2 gan bàn chân chuột (0,2 g thuốc/chân).

Chuột sau khi bôi thuốc được dán băng keo lùa Urgo Strong Adhesive Tape để tránh hao hụt lượng thuốc. Băng dán được tháo ra trước khi tiến hành thử nghiệm.

Đo thời gian phản ứng đau của chuột bằng phương pháp ngâm nóng sau khi bôi thuốc 30 phút.

Phương pháp đo: Đặt chuột lên mâm nóng, luôn duy trì ở nhiệt độ 56°C bằng hệ thống ổn nhiệt. Thời gian phản ứng với kích thích nhiệt được tính từ lúc đặt chuột lên mâm nóng đến khi chuột có phản ứng (nhảy lên hoặc liếm chân sau). Loại bỏ những chuột phản ứng quá nhanh (trước 8 giây) hoặc quá chậm (sau 30 giây). So sánh thời gian phản ứng với kích thích nhiệt giữa các lô chuột với nhau.

2.2.3. Đánh giá tác dụng giảm đau của cao Bìm bịp, Ngũ trảo, Thanh táo và Lá lốt trên mô hình gây đau cơ học [8, 9]

Chuột nhắt trắng được chia ngẫu nhiên thành 4 lô, mỗi lô 10 con:

- Lô 1 (chứng sinh học): Không bôi gì vào 2 chân chuột.
- Lô 2 (Salonpas): Bôi 0,2 g Salonpas gel vào gan bàn chân phải chuột.
- Lô 3 (Voltaren): Bôi 0,2 g Voltaren Emulgel vào gan bàn chân phải chuột.
- Lô 4 (cao BNTL): Bôi 0,2 g cao thuốc vào gan bàn chân phải chuột.

Chuột sau khi bôi thuốc được dán băng keo lùa Urgo Strong Adhesive Tape để tránh hao hụt lượng thuốc. Băng dán được tháo ra trước khi tiến hành thử nghiệm.

Bàn chân phải chuột được cho vào dụng cụ gây đau cơ học bằng đầu kim và tăng dần lực tác động từ đầu kim lên chân chuột. Chuột phản ứng với đau khi rút chân ra khỏi đầu kim.

Đo thời gian phản ứng với đau của chuột và lực gây đau đối với chuột sau khi bôi thuốc 30 phút bằng dụng cụ gây đau cơ học. So sánh thời gian phản ứng với kích thích đau của chuột và lực gây đau mà chuột chịu đựng được sau khi bôi thuốc thử.

2.2.4. Thống kê và đánh giá kết quả

Kết quả được biểu diễn dưới dạng $M \pm SD$ và xử lý thống kê bằng Excel. Sử dụng phép kiểm t-student, One-Way ANOVA (hay Student-Newman-Keuls test) để đánh giá sự khác biệt giữa các lô với độ tin cậy 95% ($p < 0,05$).

3. Kết quả

3.1. Kết quả xác định một số chỉ tiêu sơ bộ kiểm nghiệm cao Bìm bịp, Ngũ trảo, Thanh táo và Lá lốt

Bảng 2. Kết quả xác định các chỉ tiêu hóa lý của cao Bìm bịp, Ngũ trảo, Thanh táo và Lá lốt.

Chỉ tiêu	Tiến hành	Kết quả
Hình thức	Quan sát bằng mắt thường	Cao đặc BNTL có thể chất mềm, đồng nhất, màu nâu sẫm
Mất khối lượng do làm khô	Phụ lục 9.6, Dược điển Việt Nam V, số lần lặp lại thí nghiệm 3	$18,1 \pm 0,27\%$
Xác định tro toàn phần	Phụ lục 9.8, Dược điển Việt Nam V, số lần lặp lại thí nghiệm 3	$6,12 \pm 0,36\%$

Kết quả bảng 2 cho thấy, mất khối lượng do làm khô của cao BNTL là $18,1 < 20\%$, đạt yêu cầu của cao đặc theo Dược điển Việt Nam V [6].

Định tính sơ bộ các hợp chất tự nhiên trong cao BNTL được thể hiện trong bảng 3.

Bảng 3. Kết quả định tính sơ bộ các hợp chất hữu cơ trong cao Bìm bịp, Ngũ trảo, Thanh táo và Lá lốt.

Nhóm hợp chất	Thuốc thử/cách thực hiện	Kết quả	Kết luận
Tinh dầu	Bốc hơi tới cạn	Có mùi thơm	++
Alkaloid	Thuốc thử chung alkaloid	Không kết tủa	-
Coumarin	Phát quang trong kiềm	Phát quang mạnh hơn	+++
Anthraquinon	KOH 10%	Dung dịch không có màu hồng tới đỏ	-
Flavonoid	Mg/HCl đậm đặc	Dung dịch có màu hồng tới đỏ	++
Polyphenol	Thuốc thử Folin-Ciocalteu	Phức màu xanh	+++
Tannin	$FeCl_3$	Xanh rêu (polyphenol)	+
	Dung dịch gelatin muối	Tủa bông trắng (tannin)	
Saponin	Lắc mạnh với nước	Tạo bọt	+++
	Thuốc thử Liebermann	Có vòng tím nâu	
Acid hữu cơ	Bột Na_2CO_3	Không sủi bọt	-

(-): không có; (+): có ít; (++): có nhiều; (+++): có rất nhiều.

Kết quả bảng 3 cho thấy, sơ bộ xác định được các nhóm hợp chất trong cao BNTL: tinh dầu, coumarin, flavonoid, polyphenol, tannin, saponin.

Từ những kết quả thực nghiệm trên, chúng tôi đề nghị một số tiêu chuẩn chất lượng sơ bộ cho cao BNTL như ở bảng 4.

Bảng 4. Một số tiêu chuẩn chất lượng sơ bộ của cao Bìm bịp, Ngũ trảo, Thanh táo và Lá lốt.

Chỉ tiêu	Mức chất lượng
Hình thức	Cao đặc BNTL có thể chất mềm, đồng nhất, màu nâu sẫm
Mất khối lượng do làm khô	Không quá 20,0%
Xác định tro toàn phần	Không quá 7%
Định tính	Có phản ứng đặc trưng của tinh dầu, coumarin, flavonoid, polyphenol, tannin, saponin

3.2. Đánh giá tác dụng giảm đau của cao Bìm bịp, Ngũ trảo, Thanh táo và Lá lốt bằng mô hình mâm nóng

Bảng 5. Thời gian phản ứng với nhiệt độ của chuột nhắt trắng ở các lô thử nghiệm.

Lô chuột	n	Thời gian phản ứng với nhiệt độ (giây)	p so với lô chứng sinh học
Lô 1 (chứng sinh học)	10	13,45±3,40	
Lô 2 (Salonpas)	10	14,57±2,33	p>0,05
Lô 3 (Voltaren)	10	15,97±2,57	p>0,05
Lô 4 (cao BNTL)	10	15,95±3,89	p>0,05

Kết quả bảng 5 cho thấy, các thuốc đối chứng và cao BNTL đều kéo dài thời gian xuất hiện phản ứng với nhiệt độ của chuột nhắt trắng, nhưng không có ý nghĩa thống kê so với lô chứng.

3.3. Đánh giá tác dụng giảm đau của cao Bìm bịp, Ngũ trảo, Thanh táo và Lá lốt trên mô hình gây đau cơ học

Bảng 6. Thời gian phản ứng đau của chuột nhắt trắng ở các lô thử nghiệm.

Lô chuột	n	Thời gian phản ứng đau (giây)	Lực gây đau (g)
Lô 1 (chứng sinh học)	10	2,81±0,54	3,93±0,65
Lô 2 (Salonpas)	10	3,68±0,51*	5,05±0,78*
Lô 3 (Voltaren)	10	3,22±0,45*	4,46±0,59*
Lô 4 (cao BNTL)	10	3,11±0,80*	4,34±0,89*

*: p<0,05 so với lô chứng sinh học.

Kết quả bảng 6 cho thấy, Salonpas gel và Voltaren Emulgel có tác dụng làm tăng thời gian xuất hiện phản ứng đau với tác nhân cơ học của chuột nhắt trắng lên 30,9% và 14,6% so với lô chứng (p<0,05), tương ứng với việc

Salonpas gel và Voltaren Emulgel làm tăng mức chịu đau của chuột nhắt trắng với lực gây đau có ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh học (p<0,05).

Cao BNTL thể hiện tác dụng kéo dài thời gian xuất hiện phản ứng đau (tăng 10,7% so với lô chứng) và làm tăng mức chịu lực gây đau của chuột nhắt trắng (tăng 10,4% so với lô chứng) có ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh học (p<0,05).

4. Bàn luận

Định tính sơ bộ các hợp chất hữu cơ có trong cao BNTL đã xác định được các nhóm hợp chất như: tinh dầu, saponin, coumarin, flavonoid, tannin, polyphenol. Các nghiên cứu trước đây đã chứng minh: Bìm bịp chứa các flavonoid (vitexin, orientin) và các polyphenol (clinacosid A, clinacosid B) có tác dụng kháng viêm [2]; Ngũ trảo có tinh dầu (sabinen, viridiflorol) và flavonoid (casticin, vitexicarpin) giúp kháng viêm, giảm đau [3]; flavonoid (aromadendrin) của Thanh táo [4] và tinh dầu (benzyl benzoat, benzyl alcohol) trong Lá lốt [5] cũng có tác dụng kháng viêm, giảm đau [4, 5]. Các hợp chất trên tan tốt trong dung môi ethanol. Như vậy, sử dụng ethanol 70% là phù hợp để chiết được các thành phần hợp chất tự nhiên có hoạt tính kháng viêm, giảm đau trong các dược liệu BNTL, tương ứng với các tài liệu đã công bố [2-5].

Cao BNTL xuất phát từ bài thuốc dân gian [1]. Nhân dân thường hái 4 dược liệu trên, giã nát và đắp ngoài nhằm điều trị bong gân, viêm khớp, giúp giảm đau, kháng viêm [1]. Vì vậy, nhóm tác giả nghiên cứu tác dụng giảm đau của cao BNTL theo đường dùng thuốc tại chỗ như nhân dân vẫn thường sử dụng. Liều thuốc nghiên cứu là 0,2 g thuốc/chân vì lượng thuốc 0,2 g có thể đủ bôi toàn bộ gan bàn chân chuột. Đây cũng là liều dùng được sử dụng tại chỗ trên chân chuột trong các nghiên cứu khác [9].

Tác dụng giảm đau của cao BNTL được đánh giá trên các mô hình gây đau với 2 tác nhân khác nhau: tác nhân nhiệt độ (mô hình mâm nóng) và tác nhân cơ học (phương pháp gây đau cơ học).

Mô hình mâm nóng với tác nhân gây đau là nhiệt độ được sử dụng phổ biến để đánh giá tác dụng giảm đau trung ương của thuốc. Bàn chân của chuột nhắt rất nhạy cảm với nhiệt độ dù ở nhiệt độ đó vẫn chưa gây tổn thương da. Đáp ứng của chuột bao gồm: động tác nhảy lên, rút bàn chân và liếm bàn chân sau. Thuốc giảm đau trung ương có khả năng kéo dài thời gian xuất hiện những đáp ứng này của động vật nghiên cứu [10]. Kết quả nghiên cứu ở bảng 1 cho thấy, các thuốc đối chứng, bao gồm methyl salicylate (Salonpas) và diclofenac (Voltaren) là các thuốc giảm đau ngoại vi đều không làm kéo dài có ý nghĩa thống kê thời gian xuất hiện đáp ứng đau so với lô chứng sinh học. Điều này cũng phù hợp với nghiên cứu trước đây [9]. Cao BNTL được bôi 30

phút trước khi đo phản ứng đau cũng không cho thấy sự kéo dài thời gian xuất hiện phản ứng có ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh học, chứng tỏ cao BNTL không có tác dụng giảm đau trung ương.

Phương pháp gây đau cơ học sử dụng tác nhân cơ học (đầu kim) tác động vào bàn chân chuột với lực tăng dần, chuột sẽ phản ứng bằng cách rút bàn chân ra khỏi đầu kim khi đau. Trong mô hình gây đau cơ học, thuốc đối chứng Salonpas gel làm tăng thời gian phản ứng với đau của chuột nhất trắng, điều này cũng thể hiện trong nghiên cứu khác [8]. Salonpas gel chứa methyl salicylat và menthol. Methyl salicylat ức chế enzyme COX, dẫn đến giảm tổng hợp prostaglandin, giảm tính cảm thụ của ngọn dây thần kinh cảm giác với các chất trung gian hóa học gây đau như histamin, bradykinin, vì vậy làm giảm triệu chứng đau. Menthol có đặc tính gây tê cục bộ, có tác dụng đối kháng trên da và niêm mạc giúp tăng tính thấm qua da, do đó tạo ra tác dụng giảm đau hoặc gây tê cục bộ. Thuốc đối chứng Voltaren Emulgel cũng thể hiện tác dụng giảm đau trên chuột nhất trắng đối với tác nhân cơ học. Voltaren Emulgel chứa diclofenac, hoạt động bằng cách ức chế COX, làm giảm sinh tổng hợp prostaglandin và các chất trung gian gây viêm.

Trong mô hình gây đau cơ học, cao BNTL làm kéo dài thời gian phản ứng đau và tăng mức chịu lực gây đau so với lô chứng sinh học ($p < 0,05$) (bảng 6). Điều này cho thấy, cao BNTL có tác dụng giảm đau đối với các tổn thương do các tác nhân cơ học gây ra. Bim bip đã được chứng minh có tác dụng kháng viêm, làm lành vết thương [2]; Ngũ thảo, Thanh táo, Lá lốt có tác dụng kháng viêm, giảm đau [3-5]. Việc kết hợp các dược liệu này cũng thể hiện tác dụng giảm đau do tác nhân cơ học trên thực nghiệm. Tuy nhiên, các cơn đau do một tác nhân bên ngoài tạo ra có thể tạo ra phản xạ và phản ứng có ý thức nhằm bảo vệ cơ thể khỏi những tác hại có thể xảy ra. Khi đau các dây thần kinh phản ứng với các kích thích và truyền thông tin qua các sợi hướng tâm đến thần kinh trung ương. Tùy sống có liên quan nhiều đến quá trình tích hợp, điều chỉnh và chuyển tiếp cơn đau. Các xung động gây đau đi lên tùy sống đến các trung tâm xử lý của não. Các con đường chủ yếu để dẫn truyền cơn đau là đường trong vùng đồi thị. Thông qua các tác dụng dược lý của thuốc có thể thay đổi các cơn đau bằng cách giảm truyền tín hiệu đau đến não hoặc bằng cách tăng tín hiệu ức chế protein kinase C từ thần kinh trung ương [10]. Vì vậy, cần tiến hành thêm các nghiên cứu khác để chứng minh cơ chế giảm đau của cao BNTL.

Nghiên cứu mới chỉ bước đầu khảo sát tác dụng giảm đau của cao BNTL với tỷ lệ 4 dược liệu là 1:1:1:1, chiết xuất bằng ethanol 70% và đường dùng thuốc tại chỗ; cũng như chỉ xây dựng sơ bộ một số tiêu chuẩn giúp kiểm nghiệm cao BNTL. Kết quả nghiên cứu đã chứng minh được tác dụng giảm đau do tác nhân cơ học của cao BNTL trên mô hình

động vật. Để định hướng phát triển sản phẩm có hoạt tính giảm đau, kháng viêm từ dược liệu, cần xây dựng thêm các tiêu chuẩn định tính, định lượng để kiểm nghiệm và tiêu chuẩn hoá cao BNTL. Đồng thời, cần có thêm những nghiên cứu với việc sử dụng các dược liệu trên với các tỷ lệ khác nhau, các phương pháp chiết xuất khác, đường dùng thuốc khác để có thể đánh giá toàn diện hơn về tác dụng dược lý.

5. Kết luận

Cao đặc chiết xuất từ BNTL dùng tại chỗ với liều 0,2 g thể hiện tác dụng giảm đau trên mô hình thực nghiệm gây đau cơ học, nhưng không thể hiện tác dụng giảm đau trung ương trên thực nghiệm.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh đã cấp kinh phí thực hiện đề tài này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] S. Hoang (2018), "Natural medicine", *Traditional Medicine - Traditional Medicinal Plants - Natural Medicine*, Thanh Hoa Publishing House, pp.189-191 (in Vietnamese).
- [2] L.W. Khoo, S.A. Kow, M.T. Lee, et al. (2018), "A comprehensive review on phytochemistry and pharmacological activities of *Clinacanthus nutans* (Burm. f.) Lindau", *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, **2018**, DOI: 10.1155/2018/9276260.
- [3] C.J. Zheng, H.Q. Li, S.C. Ren, et al. (2015), "Phytochemical and pharmacological profile of *Vitex negundo*", *Phytother. Res.*, **29(5)**, pp.633-647, DOI: 10.1002/ptr.5303.
- [4] S. Sangeetha, K. Kavitha, K. Sujatha, et al. (2014), "Phytochemical and pharmacological profile of *Justicia gendarussa* Burm. f. - Review", *Journal of Pharmacy Research*, **8(7)**, pp.990-997.
- [5] R.M.P. Gutierrez, A.M.N. Gonzalez, C.H. Vadillo (2013), "Alkaloids from Piper: A review of its phytochemistry and pharmacology", *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, **13(2)**, pp.163-193, DOI: 10.2174/138955713804805148.
- [6] Ministry of Health (2018), *Vietnam Pharmacopoeia V*, Medical Publishing House, 2200pp (in Vietnamese).
- [7] V.D. Nguyen, V.T. Nguyen (1985), *Chemical Research Methods of Medicinal Plants*, Medical Publishing House, pp.11-48 (in Vietnamese).
- [8] T.N. Doan (2006), "Methods of studying the pharmacology of painkillers", *Institute of Medicinal Materials Methods of Studying The Pharmacological Effects of Herbal Drugs*, Science and Technics Publishing House, Hanoi, 399pp (in Vietnamese).
- [9] T.L. Dinh (2017), *Research on The Safety, Anti-Inflammatory and Analgesic Effects of Bach Xa Extract in Experimental and Clinical Cases of Rheumatoid Arthritis*, Doctor of Medicine Thesis, Hanoi Medical University, pp.45-51 (in Vietnamese).
- [10] K.T. Velazquez, H. Mohammad, S.M. Sweitzer (2007), "Protein kinase C in pain: Involvement of multiple isoforms", *Pharmacological Research*, **55(6)**, pp.578-589, DOI: 10.1016/j.phrs.2007.04.006.

Phân lập, tuyển chọn và đánh giá đặc tính các chủng *Bacillus* tiềm năng ứng dụng cho chế phẩm probiotic

Đào Gia Bách¹, Đoàn Thị Thùy Linh², Lưu Thị Thủy Ngân², Lê Thị Hội^{1*}

¹Trường Đại học Y Hà Nội, 1 Tôn Thất Tùng, phường Trung Tự, quận Đống Đa, Hà Nội, Việt Nam

²Công ty Cổ phần Kỹ nguyên Công nghệ Eramic, xã Ngọc Hòa, huyện Chương Mỹ, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 28/2/2024; ngày chuyển phản biện 1/3/2024; ngày nhận phản biện 12/3/2024; ngày chấp nhận đăng 15/3/2024

Tóm tắt:

Trong ống tiêu hóa của người có thường trú một hệ vi sinh vật với số lượng rất lớn, trong đó có hơn 400 loài vi khuẩn khác nhau. Probiotic được định nghĩa là các vi khuẩn sống khi đưa vào cơ thể với số lượng đủ sẽ sinh ra các hiệu quả có lợi cho sức khỏe; các chế phẩm probiotic (thường được gọi là men tiêu hóa) không phải là thuốc, mà được xếp vào nhóm chất bổ sung dinh dưỡng. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm khảo sát các đặc tính probiotic của 2 chủng vi khuẩn *Bacillus* phân lập từ mẫu phân của người khỏe mạnh, không sử dụng kháng sinh hay các chế phẩm probiotic trong vòng ít nhất 1 tháng. Các đặc tính cơ bản được khảo sát bao gồm khả năng gây tan máu của vi khuẩn, khả năng chịu axit dạ dày và muối mật, mức độ nhạy cảm với kháng sinh. Kết quả, trong tổng số 72 chủng phân lập được, chọn ra được 2 chủng *Bacillus* tiềm năng không gây tan máu, có khả năng sống sót và tồn tại trong môi trường khắc nghiệt của hệ tiêu hóa, nhạy cảm với các loại kháng sinh được sử dụng phổ biến cho người. Từ đó, bước đầu đánh giá được độ an toàn và tiềm năng ứng dụng của 2 chủng *Bacillus* này vào các chế phẩm probiotic.

Từ khóa: *Bacillus clausii*, *Bacillus subtilis*, kháng sinh, muối mật, pH, probiotic.

Chỉ số phân loại: 3.5

1. Đặt vấn đề

Các loài *Bacillus* được tìm thấy ở khắp mọi nơi, chúng có hình que (trực khuẩn), bắt màu gram dương, thuộc dạng hiếu khí, sinh catalase, có khả năng di động và tạo bào tử gần như hình cầu để tồn tại trong trạng thái “ngủ đông” giúp chúng sống trong điều kiện môi trường không thuận lợi. Chúng được tìm thấy ở trong đất, các nguyên liệu thực vật như cỏ, rơm, các sản phẩm lên men và đặc biệt là trong đường ruột của các loài động vật và con người. Các nghiên cứu cho thấy, vi khuẩn *Bacillus* là một trong những lợi khuẩn có khả năng tổng hợp nhiều loại enzyme tiêu hóa hỗ trợ hiệu quả trong việc hấp thu thức ăn ở người. Lợi khuẩn *Bacillus* còn tiết ra các enzyme giúp tiêu hóa những phần thức ăn khó tiêu hóa, nhằm khai thác triệt để nguồn dinh dưỡng có trong thức ăn. Không những thế, triển vọng từ các chế phẩm probiotic còn giúp phòng và điều trị bệnh nhằm thay thế cho một số loại thuốc kháng sinh, giải quyết các vấn đề mà kháng sinh không thể khắc phục được. Chính vì vậy, việc sử dụng các loài *Bacillus* làm chế phẩm sinh học probiotic đang được quan tâm đáng kể nhờ tiềm năng cải thiện sức khỏe, cân bằng hệ vi sinh vật đường ruột, tăng cường miễn dịch, nâng cao hiệu quả sử dụng thức ăn, hỗ trợ điều trị các bệnh lý liên quan đến hệ tiêu hóa.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Mẫu phân được thu thập từ người khỏe mạnh, không sử dụng kháng sinh và các chế phẩm probiotic trong vòng ít

nhất 1 tháng. Mẫu phân được gửi về phòng thí nghiệm ngay trong ngày.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Tiêu chuẩn lựa chọn

Người cho mẫu là người khỏe mạnh, không mắc các bệnh đường tiêu hóa, không sử dụng bất kỳ loại kháng sinh hay các chế phẩm probiotic trong vòng tối thiểu 1 tháng. Mẫu phân sau khi được lấy sẽ chuyển về phòng thí nghiệm trong vòng 2 giờ ở điều kiện nhiệt độ thường hoặc phải được bảo quản ở 4-8°C trong vòng 12 giờ.

2.2.2. Nuôi cấy, phân lập vi khuẩn

Chuẩn bị: Chuẩn bị dây 3 ống Eppendorf có chứa 900 µl đệm PBS 1x vô trùng được đánh dấu thứ tự 1, 2 và 3. Môi trường LB: Peptone 10 g/l, pH 7,5.

Quy trình phân lập: Lấy một lượng phân khoảng bằng hạt đỗ cho vào ống 1, vortex đều mẫu. Ủ ống 1 trong bể ổn nhiệt ở 80°C trong 30 phút. Hút 100 µl mẫu từ ống 1 sang ống 2, vortex đều. Tiếp tục hút 100 µl mẫu từ ống 2 sang ống 3, vortex đều. Hút 100 µl mẫu trong ống 3 trải lên đĩa môi trường LB, đậy kín và ủ ở 37°C trong 24-48 giờ. Sau 24-48 giờ, quan sát và chọn các khuẩn lạc có hình thái điển hình của vi khuẩn *Bacillus clausii* và *Bacillus subtilis* để tiến hành cấy chuyển sang đĩa môi trường LB khác. Quá trình cấy chuyển được lặp lại cho đến khi trên đĩa thạch chỉ xuất hiện một loại vi khuẩn thuần nhất.

*Tác giả liên hệ: Email: lethihoi@hmu.edu.vn

Isolation, selection, and evaluation of characteristics of potential *Bacillus* strains for probiotic products

Gia Bach Dao¹, Thi Thuy Linh Doan²,
Thi Thuy Ngan Luu², Thi Hoi Le^{1*}

¹Hanoi Medical University, 1 Ton That Tung Street,
Trung Tu Ward, Dong Da District, Hanoi, Vietnam

²Eramic Technology JSC,
Ngoc Hoa Commune, Chuong My District, Hanoi, Vietnam

Received 28 February 2024; revised 12 March 2024; accepted 15 March 2024

Abstract:

In the human digestive tract, there resides a very large number of microorganisms, including more than 400 different species of bacteria. Probiotics are defined as live bacteria that when introduced into the body in sufficient quantities will produce beneficial health effects. Probiotics (commonly known as digestive enzymes) are not drugs but are classified as nutritional supplements. In this study, we aim to investigate the probiotic properties of 2 strains of *Bacillus* bacteria isolated from fecal samples of healthy people, without the use of antibiotics or probiotic products for at least 1 month. The basic properties investigated include the hemolytic ability of bacteria, tolerance to artificial gastric acid and bile salt, and sensitivity to antibiotics. Out of a total of 72 isolates, 2 potential *Bacillus* strains were selected that did not cause hemolysis, were able to survive and survive in the harsh environment of the digestive system, and were sensitive to antibiotics commonly used for humans. On that basis, we initially evaluated the safety and potential application of these 2 strains to probiotic products.

Keywords: antibiotic, *Bacillus clausii*, *Bacillus subtilis*, bile salt, pH, probiotic.

Classification number: 3.5

Lưu giữ chủng vi khuẩn vừa phân lập được trong ống Eppendorf có chứa 1 ml glycerol 20%, bảo quản trong tủ -30°C.

2.2.3. Định danh vi khuẩn: Quan sát, nhận định hình thái khuẩn lạc điển hình. Nhuộm gram. Thử nghiệm catalase và oxidase. Định danh trên hệ thống định danh vi sinh vật MALDI-TOF.

2.2.4. Đánh giá khả năng tan máu: Thử nghiệm tan máu của các chủng *Bacillus* được xác định bằng cách sử dụng môi trường thạch Columbia chứa 5-7% máu cừu. Sau 24 giờ, ủ ở 37°C, hoạt tính tan máu của các chủng được

đánh giá và phân loại dựa trên sự ly giải hồng cầu trong môi trường xung quanh khuẩn lạc. Tan máu alpha (α), beta (β) và gamma (γ) xuất hiện dưới dạng màu xanh lục, trong và không có vùng rõ ràng xung quanh các khuẩn lạc tương ứng. Chủng *Staphylococcus aureus* ATCC 25922 được sử dụng để làm đối chứng dương [1]. Các chủng tan máu γ được coi là an toàn.

2.2.5. Đánh giá khả năng chịu axit dạ dày và muối mật: Khả năng chịu axit dạ dày và muối mật được tiến hành theo GRAS Notice [2]. Theo đó, sẽ tiến hành tạo ra huyền phù vi khuẩn bằng cách hòa một khuẩn lạc tươi (dưới 24 giờ nuôi cấy) từ đĩa thạch DSM vào 2 ml canh thang LB vô trùng trong ống nghiệm và ủ 37°C trong 6 giờ. Sau đó, chuyển 200 μl huyền phù đó vào ống nghiệm mới chứa 2 ml nước dùng DSM (để tạo bào tử), ủ qua đêm ở 37°C trong máy lắc. Ngày hôm sau, mẫu cấy được kiểm tra dưới kính hiển vi quang học để tìm sự hiện diện của bào tử. Sau đó, môi trường nuôi cấy được làm nóng trước ở 65°C trong 45 phút để tiêu diệt tất cả các tế bào sinh dưỡng. Môi trường nuôi cấy được làm nóng trước rồi pha loãng theo thứ tự và đặt lên các đĩa thạch DSM thành 2 bản sao để tiếp cận được gần nhất với số lượng bào tử ban đầu. Sau đó, cho chúng vào trong các dung dịch thử nghiệm trong 3 giờ: Nước muối 0,2% (2 mg NaCl/ml d H₂O); nước muối 0,3% (3 mg NaCl/ml d H₂O); muối mật 0,2% (1 mg NaClO₃ + 1 mg C₂₄H₃₉NaO₄/ml nước muối 0,2%); muối mật 0,3% (1 mg NaClO₃ + 1 mg C₂₄H₃₉NaO₄/ml nước muối 0,3%); dịch ruột mô phỏng (1 mg pancreatin/ml nước muối 0,2%); dịch dạ dày mô phỏng (3,5 mg pepsin/ml nước muối 0,2%); pH được điều chỉnh về 2, 3 và 4 sử dụng HCl đậm đặc.

Chỉ tiêu theo dõi là tỷ lệ sống tương đối được tính toán là tỷ lệ phần trăm của bào tử sau khi phát triển so với ban đầu theo công thức sau:

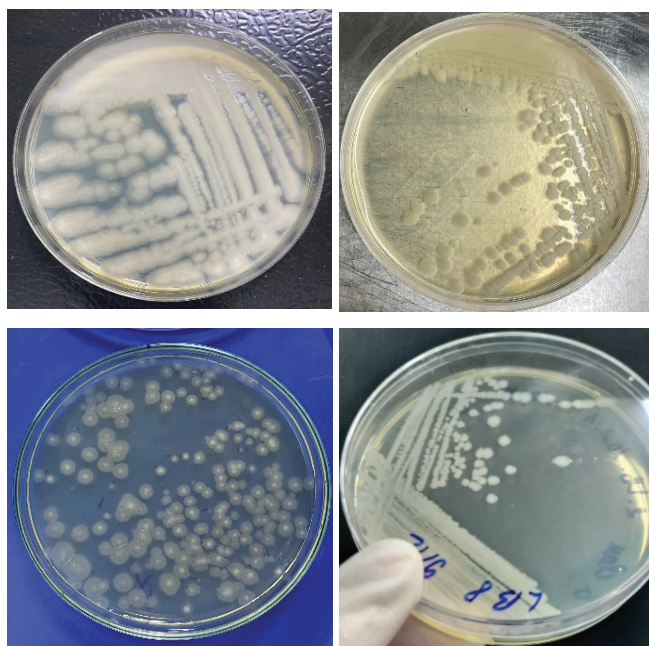
$$\text{Tỷ lệ sống (\%)} = \frac{\text{số lượng bào tử sau khi phát triển}}{\text{số lượng bào tử ban đầu}} \times 100\%$$

2.2.6. Đánh giá mức độ nhạy cảm với kháng sinh: Độ nhạy cảm của các chủng *Bacillus* được đánh giá bằng phương pháp khuếch tán đĩa Kirby Bauer theo hướng dẫn của GRAS Notice đối chiếu dựa trên tiêu chuẩn CLSI 2021 (Clinical Laboratory Standards Institute) [3]. 11 loại kháng sinh được thử nghiệm là Ampicilin sulbactam 20 μg, Gentamycine 10 μg, Clindamycine 2 μg, Chloramphenicol 30 μg, Erythromycine 15 μg, Rifampicine 5 μg, Vancomycin 30 μg, Tetracycline 30 μg, Linezolid 30 μg, Trimethoprin 25 μg, Xiprofloxacin. Kết quả được đọc bằng thước kẻ có chia vạch đến milimet hoặc thước kẹp đo đường kính vùng ức chế hoàn toàn (bao gồm cả đường kính khoảng giấy) tính theo milimet. Đường kính vùng ức chế tỷ lệ thuận với mức độ nhạy cảm của vi khuẩn.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Nuôi cấy và phân lập các chủng vi khuẩn

Trên môi trường LB, từ 50 mẫu phân của người khỏe mạnh đã phân lập được 72 chủng vi khuẩn có đặc điểm hình thái khuẩn lạc giống với vi khuẩn *Bacillus* như: khuẩn lạc màu trắng đục, dạng hình tròn, rìa răng cưa không đều (hình 1).



Hình 1. Các dạng khuẩn lạc đặc trưng trên môi trường LB.

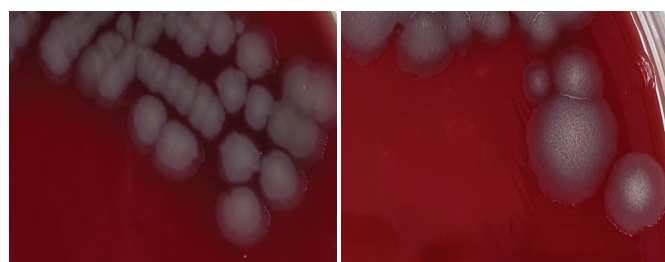
Từ 72 chủng có dạng đặc trưng của vi khuẩn *Bacillus*, tiến hành một số thử nghiệm để sàng lọc thông qua các đặc điểm của *Bacillus* như tế bào hình que, sinh bào tử, gram dương, catalase dương tính, oxidase dương tính và có khả năng di động, đã chọn được 59 chủng. Tiếp tục tiến hành định danh trên hệ thống MALDI-TOF, kết quả thu được có 7 chủng *Bacillus subtilis*, 1 chủng *Bacillus clausii* và còn lại là các chủng *Bacillus* khác trong 59 chủng (bảng 1).

Bảng 1. Kết quả định danh MALDI-TOF.

Loài	Số lượng
<i>Bacillus subtilis</i>	7
<i>Bacillus clausii</i>	1
<i>Bacillus flexus</i>	5
<i>Bacillus licheniformis</i>	11
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	6
<i>Bacillus megaterium</i>	2
<i>Bacillus pumilus</i>	3
<i>Bacillus sibiricus</i>	1
<i>Bacillus cereus</i>	23

3.2. Khả năng tan máu

Biểu hiện của hoạt động tan máu được coi là yếu tố độc lực và được bao gồm một trong các thử nghiệm đánh giá mức độ an toàn cơ bản để sàng lọc một chủng trước khi tiến hành khảo sát các đặc tính probiotic khác. Dựa theo EFSA (European Food Safety Authority) [4, 5], thử nghiệm tan máu được khuyến cáo bắt buộc để đảm bảo rằng chủng vi khuẩn không có khả năng gây độc ngay cả khi chúng được công nhận GRAS (Generally Recognized as Safe) hay QPS (Qualified Presumption of Safety) [6]. Các chủng cho thấy hoạt động gây tan máu có thể được coi là không an toàn cho các ứng dụng về chăm sóc sức khỏe con người hoặc động vật cho đến khi tác dụng của yếu tố độc lực này bị loại bỏ, chỉnh sửa hoặc được xác nhận không gây hại cho vật chủ là các sinh vật nhân thực. Trong nghiên cứu này, kết quả hình 2 cho thấy các chủng thử nghiệm không có vùng trong suốt hoặc xanh lục xung quanh khuẩn lạc của chúng trên đĩa thạch máu. Vì vậy, chúng được đánh giá không gây tan máu, đảm bảo an toàn. Nhóm nghiên cứu đặt tên cho 2 chủng *Bacillus clausii* và *Bacillus subtilis* này lần lượt là Eramic 24 và Eramic 25 để tiếp tục tiến hành các thử nghiệm tiếp theo.



Hình 2. Khuẩn lạc *Bacillus* trên thạch máu.

3.3. Khả năng chịu axit dạ dày và muối mật

Những đặc tính quan trọng và cần thiết trong việc lựa chọn các chủng vi khuẩn sản xuất chế phẩm probiotic là khả năng sống sót của vi khuẩn dưới tác dụng của pH thấp ở hệ tiêu hóa. Tại đây, ở người, sau bữa ăn dạ dày có thể giảm pH xuống mức 1 hoặc 2. Tuy nhiên, bộ đệm nhanh chóng tăng độ pH lên mức 3 hoặc 4 và sau bữa ăn pH dạ dày trở về mức nghỉ ngơi khoảng 4 hoặc 5. Theo một số nghiên cứu trước, các chủng có tiềm năng probiotic phải có khả năng chịu pH thấp giúp chúng vượt qua hàng rào pH trong dạ dày, giới hạn pH 2 và pH 3 và trong thời gian 3 giờ là giới hạn quyết định sàng lọc của các chủng [7]. Chính vì vậy mà chủng vi khuẩn được lựa chọn làm vi sinh vật tiềm năng probiotic được khảo sát khả năng chịu pH thấp với mức pH là 2, 3 và 4. Kết quả thí nghiệm đánh giá khả năng chịu pH thấp của chủng vi khuẩn được trình bày ở bảng 2. Kết quả các chủng được thử nghiệm đều cho thấy khả năng kháng dịch dạ dày, chịu được pH thấp. Ở điều kiện pH 2, các chủng đều có khả năng sống sót đã phản ánh được độ bền của bào tử vi khuẩn khi có pH ở mức 2 và thường phổ biến ở mức pH

3 và 4. Ở điều kiện pH 3 và 4, các chủng đều cho thấy độ bền và khả năng thích nghi cao để tồn tại trong môi trường axit của dạ dày và điều kiện pH 3 cũng là mức có tỷ lệ sống sót cao nhất của các chủng. So sánh kết quả giữa 2 chủng thử nghiệm cho thấy chủng Eramic 25 có khả năng sống sót cao hơn và có độ bền tốt hơn so với chủng Eramic 24. Kết quả trên cũng tương tự với nghiên cứu của N.T. Huyen và cs (2014) [8], nhóm tác giả đã chỉ ra rằng 54 dòng vi khuẩn probiotic đều thể hiện sự chống chịu cao khi được ủ trong dịch mô phỏng axit dạ dày. Ngoài ra, nghiên cứu của N.P. Hien và cs (2014) [9] đã chứng minh hầu hết các dòng vi khuẩn probiotic phân lập từ sữa dê và chế phẩm men tiêu hóa đều có khả năng chịu đựng được pH 3.

Bảng 2. Khả năng sống sót trong các dịch mô phỏng.

Thử nghiệm	Eramic 24 (%)	Eramic 25 (%)
Mô phỏng dịch ruột	65	70
Mô phỏng dịch dạ dày pH 2	47	67
Mô phỏng dịch dạ dày pH 3	76	90
Mô phỏng dịch dạ dày pH 4	68	78

Các chủng vi khuẩn *Bacillus* có khả năng chịu pH thấp là kết quả của thí nghiệm trước đã được lựa chọn và tiếp tục kiểm tra khả năng chịu muối mật. Thử nghiệm được tiến hành trên môi trường muối mật ở 37°C trong 3 giờ tương ứng với thời gian lưu thức ăn trong ruột non [10]. X.X. Zhou và cs (2007) [11] cũng đã chỉ ra rằng, vi sinh vật probiotic chỉ phát huy tác dụng có lợi lên vật chủ khi chúng định cư và tồn tại trong ruột non, đây là môi trường chứa thành phần muối mật là các yếu tố ức chế sinh trưởng của vi sinh vật. Kết quả bảng 3 cho thấy, các chủng *Bacillus* đều có thể tồn tại và phát triển dưới tác động của nồng độ muối mật. Thực tế khi quan sát, trong những giờ đầu, mật độ vi sinh vật tăng lên rất chậm. Tuy nhiên, sau đó mật độ vi sinh vật tăng lên một cách nhanh chóng. Kết quả này tương tự và được giải thích bởi Q.D. Tinh và cs (2013) [12] khi nghiên cứu về vi khuẩn probiotic. Theo đó, trong 2 giờ đầu, mật độ vi sinh vật tăng lên chậm vì đây là giai đoạn hệ vi sinh vật thích nghi với môi trường có muối mật, muối mật tác động đến tế bào vi sinh vật làm hạn chế sự phát triển của chúng. Nhưng bắt đầu từ giờ tiếp theo, tốc độ phát triển của vi sinh vật tăng lên đáng kể do một số protein và enzyme trên màng tế bào vi khuẩn có khả năng trung hòa tác động của muối mật bằng cách cắt đứt liên kết N-actyl giữa gốc steroid và chuỗi amino axit bên của axit mật. Ngoài ra, kết quả bảng 3 cũng chỉ ra rằng, ở nồng độ muối mật 0,3%, tỷ lệ sống sót của các chủng vi khuẩn cao hơn so với nồng độ muối mật 0,2%. Theo S.E. Gilliland và cs (1984) [13], 0,3% được xem là nồng độ quyết định để sàng lọc các chủng vi sinh vật có khả năng chống chịu muối mật. Kết quả này giống với nghiên cứu của T.Q. Viet và cs (2009) [14], các chủng vi sinh vật thử nghiệm đều có khả năng tồn tại trong môi trường muối

mật 0,3%. Kết quả này cao hơn so với nghiên cứu của D.N. Linh và cs (2011) [15] ở nồng độ muối mật 0,3% sau 3 giờ hầu hết các chủng có tỷ lệ sống 90-116%. Điều này rất quan trọng đối với các vi sinh vật probiotic vì muốn phát huy tác dụng có lợi lên vật chủ khi chúng định cư và tồn tại trong ruột non [16].

Bảng 3. Khả năng sống sót trong môi trường muối mật.

Nồng độ muối mật	Eramic 24	Eramic 25
Muối mật 0,2%	91%	102%
Muối mật 0,3%	94%	118%

3.4. Độ nhạy cảm với kháng sinh

Mức độ nhạy cảm với kháng sinh của 2 chủng *Bacillus* được thử nghiệm bằng phương pháp khuếch tán đĩa Kirby Bauer theo hướng dẫn của GRAS Notice dựa trên tiêu chuẩn CLSI 2021 sử dụng 11 loại kháng sinh. Kết quả bảng 4 chỉ ra rằng, chủng Eramic 24 kháng lại 3 loại kháng sinh, nhạy cảm với 7 loại và có 1 loại không tìm thấy tham chiếu. Trong khi đó, chủng Eramic 25 kháng lại 1 loại kháng sinh, nhạy cảm với 8 loại, 1 loại trung gian và có 1 loại không tìm thấy tham chiếu. Có thể thấy, chủng Eramic 25 cho kết quả với mức độ an toàn cao hơn so với chủng Eramic 24. Tuy nhiên, chủng Eramic 24 cũng được đánh giá là an toàn vì các loại kháng sinh mà chủng này nhạy cảm đều là các loại kháng sinh phổ biến sử dụng rộng rãi cho con người. Mức độ nhạy cảm với kháng sinh của chủng phải được thử nghiệm vì mục đích an toàn. Truyền gen kháng kháng sinh có thể xảy ra do các transposon, plasmid và vi khuẩn đột biến gen dẫn đến các chủng kháng kháng sinh mới [17]. Tuy nhiên, vấn đề này vẫn đang gây tranh cãi và được nghiên cứu thêm. Hơn nữa, khả năng đề kháng với một loại kháng sinh nhất định có thể là vốn có của một loài hoặc chỉ vi khuẩn. Ví dụ, một nghiên cứu được thực hiện bởi D.B.

Bảng 4. Đánh giá độ nhạy cảm với kháng sinh.

Tên kháng sinh	Đường kính vùng ức chế (mm)			
	Eramic 24		Eramic 25	
Ampicilin sulbactam 20 µg	32	Ø	44	Ø
Gentamycine 10 µg	36	S	20	S
Clindamycine 2 µg	0	R	26	S
Chloramphenicol 30 µg	0	R	24	S
Erythromycine 15 µg	0	R	22	I
Rifampicine 5 µg	44	S	28	S
Vancomycin 30 µg	22	S	12	R
Tetracycline 30 µg	28	S	16	S
Linezolid 30 µg	44	S	32	S
Trimethoprin 25 µg	40	S	32	S
Xiprofloxacine	32	S	30	S

S: nhạy cảm; I: trung gian; R: kháng; Ø: không có tham chiếu.

Adimpong và cs (2012) [18] đã cho thấy trong số 85 loài *Bacillus* được người dân Sudan sử dụng làm bánh mì *B. subtilis* subsp. *subtilis* (n=29), *B. licheniformis* (n=38) và *B. sonorensis* (n=18) tất cả đều kháng streptomycin. Tình trạng kháng kháng sinh ở mức vừa phải có thể được coi là một đặc điểm tích cực cụ thể những trường hợp như khi điều trị sử dụng kết hợp probiotic - kháng sinh. Hơn nữa, theo G.H. Choi và cs (2021) [19], nếu chế phẩm sinh học được đánh giá nhạy cảm với tất cả kháng sinh, khả năng sống sót và tồn tại của chúng sẽ bị can thiệp và mất hiệu lực.

4. Kết luận

Từ 50 mẫu phân ban đầu, chúng tôi phân lập được 72 chủng có các đặc điểm giống với vi khuẩn *Bacillus*. Qua quá trình nuôi cấy, phân lập, tuyển chọn và định danh vi sinh vật thu được 2 chủng là *Bacillus clausii* và *Bacillus subtilis*. Sau đó chúng tôi tiến hành thử nghiệm các đặc tính cơ bản probiotic của 2 chủng này. Kết quả cả 2 chủng được đánh giá an toàn, không gây tan máu, có khả năng sống sót, tồn tại trong môi trường khắc nghiệt của hệ tiêu hóa và nhạy cảm với các loại kháng sinh phổ biến được sử dụng cho con người. Các chủng này đang được tiếp tục tiến hành thử nghiệm để đánh giá độ an toàn và các đặc tính probiotic khác, từ đó ứng dụng và phát triển các chế phẩm probiotic.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được tài trợ bởi Công ty Cổ phần Kỹ nguyên Công nghệ Eramic. Các tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] N.P. Mangia, L. Saliba, P. Deiana (2019), "Functional and safety characterisation of autochthonous *Lactobacillus paracasei* FS103 isolated from sheep cheese and its survival in sheep and cow fermented milks during cold storage", *Annals of Microbiology*, **69**, pp.161-170, DOI: 10.1007/s13213-018-1416-1.

[2] GRAS Associates, LLC (2020), *GRAS Notice No. 955*, <https://www.fda.gov/media/146438/download>, accessed 1 February 2024.

[3] European Food Safety Authority (2012), "Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance", *EFSA Journal*, **10**(6), DOI: 10.2903/j.efsa.2012.2740.

[4] European Food Safety Authority (2014), "Guidance on the assessment of the toxigenic potential of *Bacillus* species used in animal nutrition", *EFSA Journal*, **12**(5), DOI: 10.2903/j.efsa.2014.3665.

[5] Clinical and Laboratory Standards Institute (2021), *M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, pp.36-46.

[6] I. Yasmin, M. Saeed, W.A. Khan, et al. (2020), "In vitro probiotic potential and safety evaluation (hemolytic, cytotoxic activity) of *Bifidobacterium* strains isolated from raw camel milk", *Microorganisms*, **8**(3), DOI: 10.3390/microorganisms8030354.

[7] N.T.D. Huong, D.T.B. Thuy (2012), "Identification and investigation of some beneficial properties of strain of *Lactobacillus fermentum* DC1 isolated from Hue sauerkraut products", *Hue University Journal of Science*, **71**(2), pp.175-185 (in Vietnamese).

[8] N.T. Huyen, N.T.T. Huong, T.T.T. Linh, et al. (2014), "Investigation of microbial composition and probiotic properties of commercial probiotic products", *Journal of Science and Development*, **12**(1), pp.65-72 (in Vietnamese).

[9] N.P. Hien, N.H. Hiep (2014), "Evaluation of probiotic potential and identification of lactic acid bacteria isolated from human milk and enzyme preparations", *Can Tho University Journal of Science*, **31**, pp.21-31 (in Vietnamese).

[10] H. Kumura, Y. Tanoue, M. Tsukahara, et al. (2004), "Screening of dairy yeast strains for probiotic applications", *Journal of Dairy Science*, **87**(12), pp.4050-4056, DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(04)73546-8.

[11] X.X. Zhou, Y.J. Pan, Y.B. Wang, et al. (2007), "In vitro assessment of gastrointestinal viability of two photosynthetic bacteria, *Rhodospseudomonas palustris* and *Rhodobacter sphaeroides*", *Journal of Zhejiang University Science B*, **8**(9), pp.686-692, DOI: 10.1631/jzus.2007.B0686.

[12] Q.D. Tinh, T.T. Trung, N.N. Duy, et al. (2013), "Survey of some probiotic activity of traditional passionfruit-kefir and *Lactobacillus casei* VTCC 186 - supplemented passionfruit-kefir", *Science and Technology Development*, **16**(3), pp.40-47 (in Vietnamese).

[13] S.E. Gilliland, T.E. Staley, L.J. Bush (1984), "Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct", *Journal of Dairy Science*, **67**(12), pp.3045-3051, DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(84)81670-7.

[14] T.Q. Viet, N.T. Len, L.V. Huyen, et al. (2009), "Effects of supplementation of probiotics into diet and drinking water on growth performance and feed efficiency in broiler chicken", *Journal of Animal Science and Technology*, **20**, pp.32-35 (in Vietnamese).

[15] D.N. Linh, N.V. Minh, T.T.K. Sa, et al. (2011), "Probiotic potential of some lactic bacteria isolated from breast milk", *Science Journal of Open University of Ho Chi Minh City*, **6**(1), pp.67-73 (in Vietnamese).

[16] R. Havenaar, J.H.J.H.I. Veld (1992), "Probiotics: A general view", *The Lactic Acid Bacteria*, **1**, pp.151-170, DOI: 10.1007/978-1-4615-3522-5_6.

[17] M. Teuber, L. Meile, F. Schwarz (1999), "Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food", *Lactic Acid Bacteria: Genetics Metabolism and Applications*, pp.115-137, DOI: 10.1007/978-94-017-2027-4_5.

[18] D.B. Adimpong, K.I. Sørensen, L. Thorsen, et al. (2012), "Antimicrobial susceptibility of *Bacillus* strains isolated from primary starters for African traditional bread production and characterisation of the bacitracin operon and bacitracin biosynthesis", *Applied and Environmental Microbiology*, **78**(22), pp.7903-7914, DOI: 10.1128/aem.00730-12.

[19] G.H. Choi, J.I.I. Fugaban, C.M. Dioso, et al. (2021), "Selection of bacteriocinogenic *Bacillus* spp. from traditional fermented Korean food products with additional beneficial properties", *Fermentation*, **7**(4), DOI: 10.3390/fermentation7040271.

Các tiếp cận quản lý danh sách người bệnh chờ ghép thận

Hoàng Giang^{1*}, Trịnh Hồng Sơn¹, Phạm Việt Cường²

¹Bệnh viện Hữu nghị Việt Đức, 40 Tràng Thi, phường Hàng Bông, quận Hoàn Kiếm, Hà Nội, Việt Nam

²Trường Đại học Y tế Công cộng, 1A Đức Thắng, phường Đức Thắng, quận Bắc Từ Liêm, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 26/1/2024; ngày chuyển phản biện 30/1/2024; ngày nhận phản biện 22/2/2024; ngày chấp nhận đăng 25/2/2024

Tóm tắt:

Mục tiêu: Mô tả tổng quan hoạt động quản lý danh sách người bệnh chờ ghép thận (NBCGT) trên thế giới và đề xuất mô hình quản lý danh sách NBCGT tại Việt Nam. **Phương pháp nghiên cứu:** Tiếp cận tổng quan tài liệu và phân tích những điểm mạnh, điểm yếu, cơ hội và thách thức trong công tác quản lý danh sách NBCGT. **Kết quả:** Mô hình quản lý danh sách NBCGT tại các nước có nền ghép tạng phát triển như Mỹ, châu Âu, Nhật Bản, Trung Quốc có nhiều điểm tương đồng. Việc quản lý danh sách NBCGT được thống nhất trên toàn quốc. Người bệnh chỉ được ghép thận khi đã có tên trong danh sách chờ ghép quốc gia. Chỉ có một tổ chức duy nhất được phép phân phối thận ghép dựa trên sự phù hợp giữa người hiến và người nhận. Việt Nam đã thực hiện được 7.380 ca ghép thận nhưng vẫn chưa có danh sách NBCGT quốc gia. Mô hình quản lý NBCGT của Mỹ và Nhật Bản có nhiều ưu điểm trong khi kinh nghiệm quản lý của Trung Quốc có sự phù hợp với đặc thù Việt Nam. **Kết luận:** Quản lý danh sách NBCGT theo mô hình của Mỹ kết hợp với Nhật Bản và học tập kinh nghiệm của Trung Quốc được xem là định hướng phù hợp với quản lý danh sách NBCGT tại Việt Nam.

Từ khóa: danh sách chờ ghép thận, người bệnh chờ ghép thận, quản lý danh sách chờ ghép thận.

Chỉ số phân loại: 3.5

1. Đặt vấn đề

Ghép thận là phẫu thuật lấy thận khỏe mạnh từ người hiến ghép vào ổ bụng của người nhận mắc bệnh. Ca ghép thận thành công đầu tiên trên thế giới được thực hiện vào ngày 23/12/1954 tại Bệnh viện Peter Bent Birmingham ở Boston, Mỹ [1]. Tại châu Á, ghép thận đã thực hiện thành công ở nhiều quốc gia như: Nhật Bản (1964), Trung Quốc (1968), Singapore (1970), Thái Lan (1972) [1]. Tại Việt Nam, ghép thận từ người hiến sống đầu tiên được thực hiện vào ngày 4/6/1992 tại Bệnh viện Quân y 103. Ghép thận từ người hiến chết não đầu tiên được thực hiện vào năm 2008 tại Bệnh viện Chợ Rẫy [2].

Về mặt tổ chức và điều hành, bất cứ quốc gia nào trên thế giới, bất cứ bệnh viện nào có ghép thận đều phải thực hiện đầy đủ 4 khâu của quá trình phức tạp gồm: chuẩn bị người nhận (người chờ ghép); chuẩn bị người hiến; chuẩn bị nhân lực, kỹ thuật ghép thận và lập kế hoạch theo dõi, chăm sóc sau ghép. Tất cả các khâu trên đòi hỏi sự phối hợp đồng bộ của các chuyên ngành trong lĩnh vực y - dược [3].

Trên thế giới, việc chuẩn bị người bệnh chờ ghép tạng nói chung và NBCGT nói riêng được thực hiện thống nhất trên toàn quốc. Danh sách NBCGT quốc gia được quản lý chặt chẽ, đồng bộ, thống nhất và mã hóa. Các phần mềm nổi tiếng về quản lý danh sách NBCGT như:

WaitlistSM của Mạng lưới chia sẻ tạng tại Mỹ (UNOS), ET (Eurotransplant) của châu Âu, OrganMatch của Úc, JOTNW của Nhật Bản... Mỗi khi có một thận hiến việc ghép cặp sẽ được thực hiện trên hệ thống máy tính (các tiêu chí ghép cặp đã được cho điểm và tích hợp lên phần mềm) để tìm ra người nhận phù hợp nhất trong danh sách NBCGT quốc gia [3-6].

Qua hơn 30 năm kể từ ca ghép thận đầu tiên tại Bệnh viện Quân y 103, Việt Nam đã thực hiện được 7.380 ca ghép thận (tính đến 30/9/2023), trong đó 7.102 ca ghép thận từ người hiến sống, chiếm 96,2%. Số ca ghép thận từ người hiến chết não và chết tim chỉ chiếm 3,8% (278 ca). Tỷ lệ ghép thận từ người hiến sống với người hiến chết tại Việt đang đi ngược với xu hướng trên thế giới và các nước trong khu vực. Cụ thể, tỷ lệ ghép thận từ người hiến sống/người hiến chết trên 1 triệu dân (pmp) bình quân trên thế giới và trong khu vực Đông Nam Á lần lượt là 5,3/15,1 ($\approx 1/3$) và 3,2/6,1 ($\approx 1/2$) [7], trong khi đó tỷ lệ này tại Việt Nam là 25/1. Mặt khác, Việt Nam chưa xây dựng được danh sách NBCGT quốc gia. Để tìm hiểu sự khác biệt này, chúng tôi tiến hành nghiên cứu “Các tiếp cận quản lý danh sách NBCGT” với mục tiêu mô tả tổng quan hoạt động quản lý danh sách NBCGT trên thế giới và đề xuất mô hình quản lý danh sách NBCGT tại Việt Nam.

*Tác giả liên hệ: Email: giangbvv@gmail.com

Approaches to managing the list of patients waiting for kidney transplantation

Giang Hoang^{1*}, Hong Son Trinh¹, Viet Cuong Pham²

¹Viet Duc University Hospital, 40 Trang Thi Street, Hang Bong Ward, Hoan Kiem District, Hanoi, Vietnam

²Hanoi University of Public Health, 1A Duc Thang Street, Duc Thang Ward, Bac Tu Liem District, Hanoi, Vietnam

Received 26 January 2024; revised 22 February 2024; accepted 25 February 2024

Abstract:

Objective: Describe an overview of the management of the list of patients waiting for a kidney transplant in the world and propose a model for the management of the list of patients waiting for a kidney transplant in Vietnam. **Methods:** Literature review and analysis of strengths, weaknesses, opportunities, and threats in managing the list of patients waiting for a kidney transplant. **Results:** The model of managing the list of patients waiting for a kidney transplant in America, Europe, Japan, and China has many similarities. The management of the list of patients waiting for a kidney transplant is unified nationwide. Patients can only receive a kidney transplant when their name is on the national transplant waiting list. Only one organization is allowed to distribute kidney transplants based on the compatibility between donor and recipient. Vietnam has performed 7,380 kidney transplants, however, up to now, Vietnam still hasn't had a national list of patients waiting for kidney transplants. The models of managing patients waiting for kidney transplants of America and Japan have many advantages, as well as China's management experience, which is suitable for Vietnam's oriented development. **Conclusions:** Managing the list of patients waiting for a kidney transplant according to the models of America, Japan and learning from China's experience is considered a suitable direction for the model of the national list of patients waiting for kidney transplants in Vietnam.

Keywords: kidney transplant waiting list, kidney wait-list management, patients waiting for a kidney transplant.

Classification number: 3.5

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Phương pháp mô tả tổng quan tài liệu và phương pháp phân tích điểm mạnh, điểm yếu, cơ hội và thách thức

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng phương pháp mô tả tổng quan tài liệu và phân tích các điểm mạnh, điểm yếu, cơ hội và thách thức (Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats - SWOT) trong việc quản lý danh sách NBCGT tại các nước có tỷ lệ và số lượng ca ghép thận cao như Mỹ, châu Âu, Nhật Bản, Trung Quốc và Việt Nam.

2.2. Phương pháp tìm kiếm thông tin

Tác giả tra cứu các quốc gia có tỷ lệ hiến ghép thận cao trên thế giới qua ấn bản năm 2021 của “Bản tin cấy ghép” [8], truy cập các trang web chính thống về hiến ghép thận tại các quốc gia có tỷ lệ ghép thận cao như Mỹ, châu Âu, Anh, Úc, Nhật Bản, Hàn Quốc, Israel, Trung Quốc. Một số cơ sở dữ liệu Pubmed/Medline, Google Scholar, Web of Science cũng NBCGT được khai thác để tìm kiếm các bài báo quốc tế và các báo cáo liên quan đến quản lý NBCGT với các từ khóa: “kidney wait-list management”, “kidney transplantation”, “patients waiting for kidney transplant” “danh sách chờ ghép”.

2.3. Nguồn dữ liệu thông tin

Thông tin và tài liệu nghiên cứu được lựa chọn theo tiêu chí sau:

- Các trang web chính thống về hiến ghép thận trên thế giới và tại các quốc gia có tỷ lệ và số lượng ca ghép thận cao như Mỹ, châu Âu, Úc, Nhật Bản, Hàn Quốc, Trung Quốc.

- Các nghiên cứu được công bố trên tạp chí (tiếng Anh hoặc tiếng Việt), hoặc luận văn/luận án (tiếng Việt) liên quan đến quản lý NBCGT.

3. Kết quả

3.1. Kết quả hoạt động quản lý danh sách người bệnh chờ ghép thận

Theo báo cáo của Tổng giám đốc Tổ chức Y tế thế giới (WHO) mỗi năm có hơn 100.000 ca ghép thận so với hơn 5 triệu người bệnh đang phải lọc máu [9]. Mỹ, Tây Ban Nha, Phần Lan là các quốc gia đi đầu trên thế giới trong lĩnh vực ghép thận với số ca ghép trên 55 ca/1 triệu dân/năm, tiếp đến là các quốc gia châu Âu, Canada và Úc. Châu Á, châu Phi là khu vực có tỷ lệ ghép thận thấp nhất thế giới, nhiều nước chưa có số liệu ghép thận cập nhật, trong đó có Việt Nam. Tính đến ngày 9/9/2022, Mỹ đã đạt 1 triệu ca ghép tạng, nhiều hơn bất kỳ quốc gia nào trên thế giới. Bình quân mỗi năm Mỹ ghép được 23.000 quả thận [10].

Trong các khâu của quá trình điều phối thận, bước đầu tiên và quan trọng là việc quản lý được danh sách NBCGT. Quản lý danh sách NBCGT ở các quốc gia cũng có sự khác biệt.

3.1.1. Tại Mỹ

Mỹ luôn là quốc gia đi đầu thế giới trong lĩnh vực ghép tạng nói chung và ghép thận nói riêng. Tại Mỹ, tất cả người bệnh muốn ghép thận đều phải có tên trong danh sách chờ ghép quốc gia và được theo dõi thường xuyên. Danh sách chờ ghép thận quốc gia là danh sách tất cả những người ở Mỹ cần ghép thận và muốn được ghép thận từ một người hiến tạng đã qua đời (người bệnh chết não hoặc chết tim). Danh sách này được quản lý bởi UNOS. Người bệnh muốn ghép thận sau khi được bác sỹ khám và đánh giá đủ điều kiện để phẫu thuật cấy ghép, họ sẽ được đưa tên vào danh sách chờ quốc gia dưới dòng trạng thái “hoạt động” (active). Trường hợp người bệnh tạm thời chưa sẵn sàng cho việc ghép thận (ví dụ, đang bị nhiễm trùng, mắc các bệnh phổi hợp...) sẽ được xếp vào nhóm “không hoạt động” (inactive). Trường hợp người bệnh bị loại ra khỏi danh sách chờ do: người bệnh tự nguyện, người bệnh bị bệnh quá nặng để có thể ghép thận, đang phục hồi chức năng thận, đã được ghép thận hoặc đã chết. NBCGT có thể đăng ký tại một hoặc nhiều trung tâm ghép để gia tăng cơ hội nhận thận. NBCGT trong danh sách ghép không có thứ tự xếp hạng, cho đến khi có người hiến, vì mỗi người hiến đều có một nhóm máu, kích cỡ và bộ gen khác nhau. Do đó, khi thông tin của một người hiến được nhập vào hệ thống máy tính quốc gia, thông tin người nhận sẽ được tự ghép với người hiến và vì vậy, mỗi lần danh sách chờ ghép lại thay đổi [11-13].

Tính đến ngày 31/12/2020 có 91.455 NBCGT. Trung bình mỗi ngày có 101 người bệnh được đưa vào danh sách chờ ghép, 13 người bệnh tử vong trong khi chờ ghép thận. Năm 2020, nước Mỹ ghép được 23.643 quả thận, trong đó 18.409 từ người hiến chết và 5.234 từ người hiến sống [14].

Về thứ tự ưu tiên trong danh sách chờ ghép, theo những quy định chung, người bệnh có nhóm máu, kích cỡ và tương thích phù hợp với người hiến, thời gian chờ trong danh sách và có mối quan hệ gần với người hiến sẽ được phân bổ thận. Trẻ em dưới 11 tuổi cần thận sẽ được tự động cộng thêm điểm.

Dữ liệu danh sách chờ có thể được nhân viên điều phối tạng của UNOS hoặc các thành viên chuyên về ghép tạng UNOS nhập trực tiếp vào cơ sở dữ liệu danh sách chờ [3]. Phần mềm quản lý danh sách người bệnh chờ ghép tại Mỹ được tích hợp trong hệ thống máy tính trung tâm điều phối chung gọi là UNetSM. Hệ thống máy tính trung tâm này của UNOS được kết nối với các tổ chức thu gom tạng phi lợi nhuận (OPOs) và các trung tâm ghép. Đây là một dịch vụ tập trung kết nối tất cả 58 OPOs, 254 bệnh viện cấy ghép và 150 phòng xét nghiệm tương thích mô. Nền

tảng này bao gồm 6 dịch vụ: “WaitlistSM”, “DonorNet ©”, “DonorNet MobileSM”, “UNetSM APIs”, “TIEDI ©”, và “TransNetSM”. Các dịch vụ này cho phép các OPOs cung cấp thông tin các tạng, cơ quan và hiến tạng dưới dạng điện tử. WaitlistSM là phần mềm dịch vụ quản lý hồ sơ y tế NBCGT. Nền tảng này tính toán điểm số cho từng người bệnh trong danh sách chờ bằng cách áp dụng các đặc điểm người bệnh được xác định trước trên hồ sơ bệnh án của người bệnh. Danh sách chờ ghép thận sẽ được lưu trữ và quản lý trong WaitlistSM. Tất cả 58 OPOs và hơn 250 bệnh viện cấy ghép trên toàn quốc làm việc trên công dữ liệu UNOS UNetSM mỗi ngày, làm cho nó trở thành một nền tảng liên tục để trao đổi và thu thập thông tin [11].

3.1.2. Tại châu Âu

Eurotransplant (ET) là một tổ chức quốc tế được thành lập năm 1967 với 12 trung tâm ghép tại 3 quốc gia tham gia một cách tự nguyện bằng cách cung cấp thông tin của các ứng viên chờ ghép thận cho Eurotransplant. Tương tự như UNOS của Mỹ, đây là một tổ chức phi lợi nhuận quốc tế hoạt động như một trung gian điều phối giữa người hiến thận và các trung tâm ghép vì lợi ích của người bệnh cần ghép thận tại tất cả các quốc gia thành viên. Mỗi người bệnh chỉ được phép đăng ký ghép thận tại một trung tâm. Khi có thông tin về người hiến thận, các trung tâm ghép này đều báo cho Eurotransplant để lựa chọn người nhận phù hợp nhất từ danh sách chờ. Sự phân bổ này đã dẫn đến sự cải thiện to lớn cho sự sống còn của thận ghép. Đến cuối năm 1970 đã có 68 trung tâm ghép tại 6 quốc gia và đến nay đã có 8 quốc gia tham gia vào Eurotransplant.

Hệ thống mạng lưới thông tin ghép tạng tại châu Âu (Eurotransplant Network Information System - ENIS) đã được phát triển để quản lý toàn bộ dữ liệu về người nhận và người hiến cũng như theo dõi diễn biến sau ghép. Hệ thống phần mềm này luôn được cập nhật một cách công khai để tất cả các nhóm nước thành viên có thể ứng dụng một cách dễ dàng nhất. Tất cả các trung tâm ghép thành viên của Eurotransplant đều có quyền truy cập vào cơ sở dữ liệu máy tính trung tâm ENIS. Trong cơ sở dữ liệu này, các trung tâm ghép nhập thông tin chung và thông tin y tế của người nhận và người hiến. Đây là nguyên tắc cơ bản để tạo sự kết hợp tốt nhất. Khi thông tin được nhập vào cơ sở dữ liệu trung tâm của ENIS, người bệnh được đưa vào danh sách chờ (liên) quốc gia. Thời gian chờ của người bệnh thận bắt đầu từ ngày chạy thận đầu tiên.

Với dân số 8 nước thành viên khoảng 137 triệu người tính đến cuối năm 2022 Eurotransplant đã có 9.939 người bệnh trong danh sách chờ ghép thận và 2.991 thận được ghép từ người hiến chết (khoảng 30% người bệnh chờ ghép được ghép thận từ người hiến chết mỗi năm) [15].

3.1.3. Tại Nhật Bản

Cũng giống như các hệ thống điều phối tạng ở Mỹ hay châu Âu, bất kỳ người bệnh nào muốn ghép tạng đều phải đăng ký với Mạng lưới ghép tạng Nhật Bản (Japan Organ Transplant Network - JOTNW). Các thủ tục liên quan đến việc đăng ký vào danh sách chờ ghép được hướng dẫn cụ thể trên trang web của JOTNW (<https://www.jotnw.or.jp/transplant/wish/>). Việc thiết lập hệ thống đăng ký gồm 2 nhóm là nhóm người bệnh ghép thận và người bệnh ghép các tạng còn lại. Cụ thể đối với ghép thận người bệnh phải tự hoàn thành 5 bước sau mới có thể có tên trong danh sách chờ ghép:

Bước 1: Tham vấn về mong muốn ghép tại cơ sở tư vấn. Cơ sở tư vấn có thể là các cơ sở lọc máu, tại đó bác sỹ sẽ giới thiệu người bệnh và hoàn thành một số hồ sơ để gửi đến các trung tâm ghép.

Bước 2: Đăng ký tại một trung tâm ghép. Người bệnh sẽ trả lời có đồng ý với các quy định ghép hay không. Nếu đồng ý sẽ được ký tên và ghi địa chỉ vào mẫu đăng ký.

Bước 3: Lấy máu để xét nghiệm tại trung tâm ghép. Thực hiện xét nghiệm HLA và các xét nghiệm tế bào học.

Bước 4: Đăng ký yêu cầu ghép. Cơ sở ghép sẽ thực hiện đăng ký từ JOTNW. Một “Mẫu đăng ký ghép” với dữ liệu y tế cần thiết để chọn ứng viên sẽ được nhập vào hệ thống của JOTNW. Dữ liệu nhập vào hệ thống và đăng ký tại thời điểm xác nhận nộp phí đăng ký mới (hoặc miễn phí) sẽ là ngày đăng ký.

Bước 5: Thông báo hoàn thành đăng ký. Trong khoảng một tháng, giấy chứng nhận đăng ký ghép thận sẽ được gửi đến cho người bệnh, kèm theo biên lai.

Tất cả các dữ liệu liên quan đều được chuyển về hệ thống quản lý thông tin tại JOTNW.

Hiện tại, số người hiến thận chết não ở Nhật Bản còn rất thấp, nguồn thận chủ yếu thu được vẫn là từ người hiến sống. Ghép thận từ người hiến chết chỉ chiếm 10%. Năm 2020 số ca ghép thận từ người hiến sống đạt 1.556 ca và 141 ca từ người hiến đã chết.

3.1.4. Tại Trung Quốc

Trung Quốc bắt đầu thực hiện việc ghép tạng từ những năm 1960 [16] và từ đó trở thành một trong những quốc gia có số ca phẫu thuật ghép tạng lớn nhất thế giới. Năm 2011 hệ thống quản lý ghép tạng Trung Quốc (The China Organ Transplant Response System - COTRS) được đưa vào sử dụng. Qua đó, các tạng được phân bổ tự động theo chính sách quốc gia dựa trên nguyên tắc được quốc tế công nhận và kinh nghiệm đã được tham khảo để xác định ưu tiên phân bổ như: khu vực, mức độ nghiêm trọng của bệnh, sự phù hợp của nhóm máu, mô... Không tổ chức, cá nhân nào được phép phân phối tạng của người hiến tạng bên ngoài hệ thống, từ đó

đảm bảo rằng việc phân bổ nội tạng của người hiến là công bằng, minh bạch và có thể truy vết. Năm 2013, tất cả các tỉnh/thành phố của Trung Quốc đều đã sử dụng COTRS giúp cho công việc điều phối trở nên dễ dàng và hệ thống hơn. Cùng với việc cấm hoàn toàn việc lấy tạng từ phạm nhân tử hình, vào năm 2015, Trung Quốc cũng ban hành hướng dẫn toàn quốc về hiến tạng giúp nâng tầm nhận thức và hỗ trợ của cộng đồng về vấn đề này. Đồng thời, Trung Quốc cũng đã hình sự hóa việc mua bán tạng bằng cách sửa đổi Luật Hình sự năm 2011, củng cố khuôn khổ pháp lý trong lĩnh vực cấy ghép. Nhiều cá nhân đã bị kết án, bỏ tù liên quan đến việc mua bán tạng. Mặt khác, Hội Chữ thập đỏ Trung Quốc cũng tham gia rất tích cực vào công tác tuyên truyền, vận động hiến tạng thông qua việc xây dựng đội ngũ tuyên truyền, vận động được đào tạo bài bản trên khắp cả nước. Đội ngũ tuyên truyền viên này phải trải qua quá trình kiểm tra, đánh giá trình độ và cấp chứng chỉ hằng năm để đảm bảo tính hiệu quả và chuyên nghiệp. Trung Quốc cũng phát triển, cập nhật và sửa đổi các tiêu chí, thông số kỹ thuật đánh giá chết não (dành cho cả người lớn và trẻ em) qua đó thúc đẩy việc xác định chết não thường xuyên và tiêu chuẩn hóa trên khắp đất nước. Tất cả những hành động trên đã giúp Trung Quốc có một bước tiến dài về số người hiến tạng và số ca phẫu thuật. Với 20.201 ca ghép tạng trong năm 2018, Trung Quốc vươn lên đứng thứ hai thế giới (sau Mỹ) về cả số ca ghép tạng và số lượng người hiến chết não. Năm 2019, hơn 12.000 ca ghép thận được thực hiện tại Trung Quốc, trong đó 85% thận được lấy từ người hiến chết. Tính đến cuối năm 2019 Trung Quốc có gần 50.000 người trong danh sách chờ ghép thận [17].

3.1.5. Tại Việt Nam

Công tác ghép tạng của Việt Nam tuy xuất phát sau những quốc gia đi đầu 40 năm nhưng lại có tốc độ phát triển vượt bậc và đuổi kịp các nước phát triển về mặt kỹ thuật. Sau hơn 30 năm kể từ ca ghép thận đầu tiên, Việt Nam đã có 24 bệnh viện được Bộ Y tế công nhận đủ điều kiện thực hiện kỹ thuật lấy và ghép thận. Với tổng số ca ghép thận trên cả nước đã đạt 7.380 ca (tính đến 30/9/2023). Ghép thận đã là phẫu thuật thường quy tại nhiều trung tâm ghép thận trên cả nước. Tuy nhiên, 95% số ca ghép tạng tại Việt Nam là ghép từ người hiến sống, thực tế này đang đi ngược với xu thế chung của thế giới là ghép tạng từ người hiến chết. Hiện nay, mỗi trung tâm ghép thận có một danh sách NBCGT của riêng mình. Khi có thận hiến, bác sỹ ghép thận sẽ lựa chọn người nhận trong danh sách chờ phù hợp nhất bằng cách sàng lọc theo các tiêu chí của sự hòa hợp như: nhóm máu, HLA, chiều cao, cân nặng, thời gian chạy thận... Phương pháp này khá đơn giản, dễ thực hiện, nhưng rất khó đảm bảo được tính khách quan, minh bạch trong việc lựa chọn người nhận.

3.2. Phân tích điểm mạnh, điểm yếu, cơ hội và thách thức các mô hình quản lý danh sách chờ ghép thận

Kết quả phân tích SWOT các mô hình quản lý danh sách NBCGT được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Phân tích điểm mạnh, điểm yếu, cơ hội và thách thức các mô hình quản lý danh sách người bệnh chờ ghép thận.

Quốc gia/tổ chức/ tên phần mềm quản lý	Điểm mạnh	Điểm yếu	Cơ hội	Thách thức
Mỹ/UNOS/ UNetSM/WaitlistSM	- Nổi tiếng, mạng lưới rộng khắp nước Mỹ; - Là tổ chức duy nhất, độc quyền quản lý và điều phối việc phân bổ thận. Đảm bảo được tính thống nhất, chính xác và nhanh chóng; - Người bệnh chỉ được ghép thận khi có tên trong danh sách chờ ghép quốc gia (hoặc liên quốc gia); - Người hiến và người nhận được mã hóa thông tin. Đảm bảo sự bí mật, công khai, minh bạch; - Đảm bảo sự công bằng và an sinh xã hội; - Người hiến chết chiếm đa số.	- Đòi hỏi hệ thống lưu trữ cơ sở dữ liệu rất lớn, đội ngũ công nghệ thông tin (IT) mạnh và hùng hậu; - Kinh phí đầu tư và vận hành lớn; - Người bệnh được phép đăng ký ghép thận tại một hoặc nhiều trung tâm ghép (phải trả phí) để gia tăng cơ hội ghép do vậy gián tiếp tăng cơ hội cho người có điều kiện kinh tế.	- Thu hút được các dịch vụ gia tăng để tăng doanh thu; - Các đơn vị bảo hiểm tham gia chi trả nhiều hơn; - Số lượng ca ghép tăng, doanh thu tăng; - Quản lý được người nhận chặt chẽ trên toàn quốc, nâng cao uy tín của tổ chức; - Góp phần đảm bảo an sinh xã hội; - Thuận lợi cho công tác tuyên truyền, vận động hiến tạng từ người hiến chết, đặc biệt đối với các tạng không thể thay thế như tim, gan, phổi.	- Kinh phí để duy trì ổn định hệ thống cơ sở dữ liệu và trả lương cho đội ngũ IT; - Tính bảo mật và nguy cơ rò rỉ thông tin, mất số liệu, sự cố mạng... - Dễ mang tính độc quyền, mất công bằng trong xác định các tiêu chí ưu tiên.
Nhật Bản/JOTNW	- Là phần mềm điều phối duy nhất; - Người bệnh chỉ được ghép thận khi có tên trong danh sách chờ ghép quốc gia; - Người hiến và người nhận được mã hóa thông tin, đảm bảo sự bí mật, công khai, minh bạch; - Ghép thận từ người hiến sống chiếm 90%.	- Đòi hỏi hệ thống lưu trữ cơ sở dữ liệu rất lớn, đội ngũ IT mạnh và hùng hậu; - Kinh phí đầu tư và vận hành lớn; - Mất nhiều năm để giải quyết các thủ tục về pháp lý liên quan đến ghép tạng từ người hiến chết; - Không có quy định về việc hiến tạng từ người chết não và điều đó phụ thuộc vào quyết định từ bác sỹ phụ trách; - Tỷ lệ ghép thận từ người hiến chết thấp.	- Quản lý được người nhận chặt chẽ trên toàn quốc, nâng cao uy tín của tổ chức, thu hút được các dịch vụ gia tăng và các đơn vị bảo hiểm tham gia chi trả nhiều hơn, góp phần đảm bảo an sinh xã hội; - Người bệnh suy tim, gan, phổi ít có cơ hội được ghép.	- Kinh phí lớn; - Hoàn thiện cơ sở pháp lý để đảm bảo sự chặt chẽ khi đánh giá chết não, chết tim; - Dễ xảy ra khiếu kiện, thắc mắc của gia đình người bệnh; - Tuyên truyền vận động hiến tạng sẽ khó khăn.
Trung Quốc/COTRS	- Phần mềm điều phối thận duy nhất và thống nhất trên cả nước. Các quy định, quy trình được cập nhật, bổ sung đầy đủ và tuân thủ; - Hội Chữ thập đỏ đóng vai trò như bên thứ 3 kết nối giữa người hiến với bệnh viện và người nhận; - Đứng thứ 2 thế giới về số lượng ca ghép và số người hiến chết, người hiến chết chiếm đa số.	- Đòi hỏi hệ thống lưu trữ cơ sở dữ liệu rất lớn, đội ngũ IT mạnh và hùng hậu; - Kinh phí đầu tư và vận hành lớn; - Mất nhiều năm để thay đổi chính sách ghép tạng. Từ việc lấy tạng của tử tù sang lấy tạng ở người hiến chết não, chết tim và chết não sau đó chết tim.	- Phát triển ngành ghép thận; - Tăng tính công khai, minh bạch trong việc phân phối thận ghép, góp phần đảm bảo an sinh xã hội; - Dân số hơn 1,4 tỷ người, số lượng người bệnh chờ ghép thận và được ghép thận ước tính nhiều nhất thế giới; - Thuận lợi cho tuyên truyền, vận động hiến tạng sau khi chết.	- Kinh phí để duy trì ổn định hệ thống cơ sở dữ liệu và trả lương cho đội ngũ IT; - Tính bảo mật và nguy cơ rò rỉ thông tin, mất số liệu, sự cố mạng... - Dễ mang tính độc quyền, mất công bằng trong xác định các tiêu chí ưu tiên và phân phối thận ghép.
Việt Nam/ Quanlyvadieuphoi	- Có sự quan tâm của Chính phủ, Bộ Y tế, các tổ chức chính trị xã hội, đặc biệt đã có sự tham gia, phối hợp với Hội Chữ thập đỏ các cấp trong công tác tuyên truyền vận động hiến tạng; - Trung tâm Điều phối ghép tạng quốc gia hiện đang là tổ chức duy nhất có đầy đủ tư cách pháp nhân thực hiện việc điều phối tạng ghép trên cả nước; - 24 cơ sở y tế trên cả nước (từ Bắc vào Nam) đã thực hiện được ghép thận. Làm chủ được kỹ thuật ghép thận.	- Bất cập trong Luật Hiến, lấy ghép mô, bộ phận cơ thể người và hiến, lấy xác sau gần 20 năm Luật có hiệu lực khi chưa có văn bản dưới Luật để hướng dẫn chi tiết thực hiện như: nghị định, thông tư... - Chưa có danh sách NBCGT quốc gia. Chưa quản lý được thông tin người hiến và người nhận thận (giữ bí mật về các thông tin có liên quan đến người hiến, người được ghép)... - Người hiến sống chiếm đa số; - Nhận thức về hiến, ghép thận của nhân viên y tế, người bệnh và cả người dân còn nhiều hạn chế. Đội ngũ nhân viên tư vấn, vận động hiến tạng chưa có, nếu có thì rải rác và tự phát tại các đơn vị có ghép tạng. Sự phối hợp trong công tác điều phối còn nhiều khó khăn và bất cập; - Đội ngũ cán bộ nhân viên Trung tâm Điều phối ghép tạng quốc gia còn quá mỏng và thiếu kinh nghiệm. Kinh phí đầu tư cho IT phục vụ công tác quản lý hiến ghép mô tạng còn rất khiêm tốn.	- Phát triển ngành ghép thận trở thành mũi nhọn trong y tế; - Quản lý được người nhận chặt chẽ trên toàn quốc, nâng cao uy tín của Trung tâm; - Hoàn thiện các khâu còn lại của quá trình ghép thận theo hướng đi tất, đón đầu. Góp phần đảm bảo an sinh xã hội; - Dân số khoảng 100 triệu, số lượng NBCGT nhiều. Hàng chục nghìn người chết vì tai nạn giao thông hằng năm là nguồn hiến tạng lớn được khai thác tốt và tuân thủ đúng pháp luật.	- Cản trở sự phát triển ngành ghép tạng. Thiếu tính khả thi trong việc thực hiện luật vì không có hướng dẫn chi tiết. Ví dụ người hiến tạng >18 tuổi, không có chế tài xử lý cơ sở y tế vi phạm... - Nạn buôn bán thận phát triển, gây mất an ninh trật tự xã hội; - Chưa thể tuyên truyền, vận động hiến mô tạng một cách bài bản, thống nhất và chuyên nghiệp. Thiếu tuân thủ các quy định, quy trình trong quản lý, điều phối; - Không thể hoàn thành chức năng, nhiệm vụ của Trung tâm Điều phối ghép tạng quốc gia.

3.3. Đề xuất mô hình quản lý danh sách chờ ghép thận tại Việt Nam

Qua phân tích SWOT các mô hình quản lý danh sách NBCGT tại các nước trên thế giới cũng như thực trạng tại Việt Nam như trên, chúng ta có thể thấy một số điểm cốt lõi được áp dụng cho mô hình quản lý danh sách NBCGT mà các nước Mỹ, châu Âu, Nhật Bản, Trung Quốc đều đã thực hiện như sau:

- Ghép thận từ người hiến chết (chết não hoặc chết tim) phải là định hướng phát triển cho ngành ghép tạng nói chung và ghép thận nói riêng (xu thế chung của thế giới).

- Chỉ có một danh sách NBCGT quốc gia, chỉ một tổ chức quản lý và phân phối thận ghép dựa trên điểm số của sự ưu tiên, chỉ người bệnh có tên trong danh sách chờ ghép mới được ghép thận.

- Tổ chức quản lý và phân phối thận phải dựa trên sự công bằng, minh bạch và độc lập với các trung tâm ghép trên cả nước.

Từ những phân tích nêu trên, chúng tôi đề xuất mô hình quản lý danh sách chờ ghép thận tại Việt Nam là kết hợp mô hình quản lý của Mỹ, Nhật Bản và học tập kinh nghiệm của Trung Quốc. Cụ thể, Trung tâm Điều phối ghép tạng quốc gia quản lý 3 trung tâm đặt tại 3 miền: Bắc (tại Hà Nội); Trung (tại TP Huế); Nam (tại TP Hồ Chí Minh), gọi tắt là Trung tâm miền. Trung tâm miền sẽ quản lý danh sách NBCGT tại mỗi miền tương ứng (danh sách NBCGT của cả 3 miền nằm trong danh sách chờ ghép thận quốc gia). Mạng lưới cập nhật thông tin chờ ghép thận lên Trung tâm miền (đồng thời cũng là cập nhật lên Trung tâm Điều phối ghép tạng quốc gia) là các bệnh viện đa khoa tỉnh. Các bệnh viện đa khoa tỉnh phải có đơn vị khám sàng lọc, đánh giá người bệnh có nhu cầu ghép thận đáp ứng được yêu cầu chờ ghép và cập nhật thông tin lên Trung tâm miền (theo mẫu phiếu và tiêu chí thống nhất trên cả nước. Tối thiểu phải có nhóm máu và xét nghiệm HLA, thời gian chạy thận...).

Việc kiểm tra, giám sát và xử lý vi phạm một cách nghiêm túc (kinh nghiệm của Trung Quốc) sẽ làm giảm số lượng ghép thận trong thời gian ngắn ban đầu, nhưng sẽ đem lại lợi ích to lớn không chỉ về số lượng, chất lượng ghép thận mà còn đảm bảo tính pháp lý công bằng, minh bạch và bền vững về lâu dài.

4. Kết luận

Kết hợp mô hình quản lý danh sách NBCGT của Mỹ (UNOS), Nhật Bản (JOTNW) và học tập kinh nghiệm ghép thận của Trung Quốc được xem là định hướng phù hợp với mô hình quản lý danh sách NBCGT tại Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] M. Hatzinger, M. Stastny, P. Grützmacher, et al. (2016), "The history of kidney transplantation", *Urologe A*, **55**(10), pp.1353-1359, DOI: 10.1007/s00120-016-0205-3.
- [2] Socialist Republic of Vietnam (2017), *Vietnam Kidney Transplant Guide*, Medical Publishing House, 365pp (in Vietnamese).
- [3] United Network for Organ Sharing (2021), "Data dashboard monitors equity in access to transplant", <https://unos.org/news/insights/equity-in-access-to-transplant-dashboard/>, accessed 20 September 2023.
- [4] M. Niemann, N. Lachmann, K. Geneugelijk, et al. (2021), "Computational Eurotransplant kidney allocation simulations demonstrate the feasibility and benefit of T-cell epitope matching", *PLOS Comput. Biol.*, **17**(7), DOI: 10.1371/journal.pcbi.1009248.
- [5] Eurotransplant (2023), "Allocation of organs", <https://www.eurotransplant.org/allocation/allocation-of-organs/>, accessed 20 September 2023.
- [6] Organ and Tissue Authority (2023), "OrganMatch", <https://donatelife.gov.au/organmatch>, accessed 20 September 2023.
- [7] D. Mudiayi, S. Shojai, I. Okpechi, et al. (2022), "Global estimates of capacity for kidney transplantation in world countries and regions", *Transplantation*, **106**(6), pp.1113-1122, DOI: 10.1097/TP.0000000000003943.
- [8] The Council of Europe European Committee (Partial Agreement) on Organ Transplantation (2021), *Newsletter Transplant: International Figures on Donation and Transplantation 2020*, **26**, 112pp.
- [9] World Health Organization (2009), *Human Organ and Tissue Transplantation, Report by The Secretariat*, Sixty-second World Health Assembly.
- [10] A.K. Bello, M. McIsaac, I.G. Okpechi, et al. (2021), "International Society of Nephrology Global Kidney Health Atlas: Structures, organization, and services for the management of kidney failure in North America and the Caribbean", *Kidney International Supplements*, **11**(2), pp.e66-e76, DOI: 10.1016/j.kisu.2021.01.001.
- [11] United Network for Organ Sharing (2023), "How UNOS, OPOs and transplant programs work together to save lives", <https://unos.org/about/national-organ-transplant-system/>, accessed 20 September 2023.
- [12] National Kidney Foundation (2023), "The kidney transplant waitlist", <https://www.kidney.org/atoz/content/transplant-waitlist>, accessed 20 September 2023.
- [13] United Network for Organ Sharing (2023), "Getting on the list", <https://transplantliving.org/before-the-transplant/about-organ-allocation/getting-on-the-list/>, accessed 20 September 2023.
- [14] American Kidney Fund (2023), "Transplant waiting list", <https://www.kidneyfund.org/kidney-donation-and-transplant/transplant-waiting-list>, accessed 20 September 2023.
- [15] Eurotransplant (2023), "Yearly statistics", <https://www.eurotransplant.org/statistics/yearly-statistics/>, accessed 20 September 2023.
- [16] Z. Zhang, Z. Liu, B. Shi (2022), "Global perspective on kidney transplantation: China", *Kidney360*, **3**(2), pp.364-367, DOI: 10.34067/KID.0003302021.
- [17] B.Y. Shi, Z.J. Liu, T. Yu (2020), "Development of the organ donation and transplantation system in China", *Chinese Medical Journal*,

Mô hình bệnh tật tại Khoa Y học Cổ truyền một số bệnh viện huyện tỉnh Quảng Bình

Nguyễn Tuấn Linh^{1*}, Đoàn Quang Huy²

¹Bệnh viện Đa khoa huyện Bố Trạch, thị trấn Hoàn Lão, huyện Bố Trạch, tỉnh Quảng Bình, Việt Nam

²Học viện Y Dược học Cổ truyền Việt Nam, 2 Trần Phú, phường Mộ Lao, quận Hà Đông, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 2/8/2022; ngày chuyển phản biện 5/8/2022; ngày nhận phản biện 23/8/2022; ngày chấp nhận đăng 26/8/2022

Tóm tắt:

Nghiên cứu được thực hiện với mục tiêu mô tả mô hình bệnh tật của người bệnh điều trị nội trú tại Khoa Y học Cổ truyền của 3 bệnh viện huyện tỉnh Quảng Bình năm 2019-2021 theo phương pháp mô tả cắt ngang. Đối tượng nghiên cứu bao gồm tất cả các bệnh nhân điều trị nội trú tại Khoa Y học Cổ truyền của 3 bệnh viện: Bệnh viện Đa khoa huyện Bố Trạch, Bệnh viện Đa khoa huyện Lệ Thủy và Bệnh viện Đa khoa huyện Tuyên Hóa trong thời gian từ tháng 1/2019 đến hết tháng 12/2021. Số liệu sau thu thập được xử lý bằng thuật toán thống kê y sinh học dưới sự hỗ trợ của phần mềm SPSS 20.0. Kết quả cho thấy, năm 2019 chứng tọa cốt phong chiếm 35,4%, năm 2020 tỷ lệ này giảm nhẹ với 30,7%, năm 2021 chứng bệnh chiếm tỷ lệ lớn nhất là chứng tý (44,0%). Năm 2019 có 97,85% trường hợp có kết quả điều trị “ổn định ra viện”. Thời gian điều trị nội trú tăng dần qua các năm (năm 2019 là 7,88±1,39 (ngày), năm 2020 là 8,98±1,59 (ngày) và năm 2021 là 9,64±1,69 (ngày).

Từ khóa: mô hình bệnh tật, tỉnh Quảng Bình, y học cổ truyền.

Chỉ số phân loại: 3.5

1. Đặt vấn đề

Mô hình bệnh tật ở bệnh viện là các số liệu thống kê về số lượng người bệnh vào khám, chữa bệnh, tình hình mắc từng loại bệnh, những yếu tố ảnh hưởng đến mô hình bệnh tật như điều kiện làm việc, khí hậu, tuổi, giới tính... trong những khoảng thời gian nhất định [1].

Bệnh tật, theo nghĩa rộng nhằm chỉ bất kỳ tình trạng nào làm suy yếu chức năng bình thường của cơ thể. Bệnh tật là khía cạnh sinh học của sự không khỏe, chủ yếu là rối loạn chức năng sinh lý.

Y học cổ truyền không phân chia bệnh tật thành từng bệnh riêng rẽ mà dựa trên tư chẩn, bắt cương quy nạp các triệu chứng thành các chứng hay hội chứng bệnh. Tại Việt Nam, để góp phần dễ dàng phân loại bệnh tật y học cổ truyền, Bộ Y tế đã ban hành “Danh mục mã bệnh y học cổ truyền (Quyết định số 6061/QĐ-BYT ngày 29/12/2017)” được mã hoá khá chi tiết theo dạng 6 hoặc 7 ký tự, tương ứng với các bệnh được mã hoá bằng ICD-10 để dễ dàng phân loại, thống kê bệnh tật một cách chính xác hơn [2].

Quảng Bình là một tỉnh thuộc vùng Duyên hải Bắc Trung Bộ, trong những năm qua ngành y tế Quảng Bình không ngừng phát triển, công tác đào tạo nguồn nhân lực y tế được chú trọng và phát triển. Hoạt động nghiên cứu khoa học được đẩy mạnh. Các bác sỹ, dược sỹ và nhiều cán bộ có trình độ đại học khác đã tham gia nghiên cứu, hoàn thành được trên 50 công trình, tham gia hội nghị khoa học trong tỉnh, của các viện đầu ngành Trung ương và khu vực. Mặc dù vậy, tỉnh Quảng Bình chưa có nghiên cứu nào về mô hình bệnh tật tại Khoa Y học Cổ truyền, do đó việc đánh giá và

nghiên cứu mô hình này là cần thiết và có ý nghĩa thực tiễn đối với việc lập kế hoạch và xây dựng phát triển nguồn nhân lực phục vụ công tác khám chữa bệnh cũng như công tác y tế dự phòng của tỉnh.

Xuất phát từ thực tiễn đó, chúng tôi tiến hành thực hiện đề tài nghiên cứu này với mục tiêu: Mô tả mô hình bệnh tật của người bệnh điều trị nội trú tại Khoa Y học Cổ truyền của 3 bệnh viện huyện tỉnh Quảng Bình từ năm 2019 đến năm 2021.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

Nghiên cứu dựa trên hồ sơ bệnh án của các bệnh nhân nội trú tại Khoa Y học Cổ truyền của 3 bệnh viện là: Bệnh viện Đa khoa huyện Bố Trạch, Bệnh viện Đa khoa huyện Lệ Thủy và Bệnh viện Đa khoa huyện Tuyên Hóa trong thời gian từ tháng 1/2019 đến hết tháng 12/2021.

Tiêu chuẩn lựa chọn: Những hồ sơ bệnh án được ghi chép rõ ràng, đầy đủ, các dữ liệu đáp ứng mục tiêu nghiên cứu của đề tài.

Tiêu chuẩn loại trừ: Các bệnh án bảo mật thông tin, hồ sơ bệnh án không rõ ràng, không nằm trong thời gian nghiên cứu.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Thiết kế nghiên cứu: Nghiên cứu hồi cứu, mô tả cắt ngang, thu thập số liệu thứ cấp.

Thời gian, địa điểm: Từ tháng 5/2022 đến tháng 11/2022 tại 3 bệnh viện tuyến huyện.

*Tác giả liên hệ: Email: nguyentuanlinh201193@gmail.com

Disease models of traditional medicine departments of some district hospitals in Quang Binh province

Tuan Linh Nguyen^{1*}, Quang Huy Doan²

¹Bo Trach District General Hospital, Hoan Lao Town,
Bo Trach District, Quang Binh Province, Vietnam

²Vietnam University of Traditional Medicine,
2 Tran Phu Street, Mo Lao Ward, Ha Dong District, Hanoi, Vietnam

Received 2 August 2022; revised 23 August 2022; accepted 26 August 2022

Abstract:

This study was carried out with the aim of describing the disease patterns of inpatients at the Department of Traditional Medicine of three district hospitals in Quang Binh province in 2019-2021 by cross-sectional descriptive method. The research subjects of this study include all inpatients at the Department of Traditional Medicine of three hospitals, namely Bo Trach District General Hospital, Le Thuy District General Hospital, and Tuyen Hoa District General Hospital from January 2019 to the end of December 2021. The collected data are processed by biomedical statistical algorithms with the support of SPSS 20.0 software. The research results showed that in 2019 sciatica accounted for 35.4%. In 2020, this data slightly decreased to 30.7%, in 2021 the disease accounted for the largest proportion was schizophrenia (44.0%). In 2019, 97.85% of cases had treatment results "Stable and discharged". In addition, the duration of inpatient treatment gradually increased over the years (2019 was 7.88 ± 1.39 (day), 2020 was 8.98 ± 1.59 (day), and 2021 was 9.64 ± 1.69 (day)).

Keywords: disease model, Quang Binh province, traditional medicine.

Classification number: 3.5

Chọn mẫu và cỡ mẫu: Chọn toàn bộ bệnh án đủ tiêu chuẩn nghiên cứu trong thời gian trên với tổng 13.833 bệnh án. Sổ sách, báo cáo lưu trữ liên quan đến nguồn lực, giường bệnh và hoạt động khám, chữa bệnh tại Khoa Y học Cổ truyền của Bệnh viện Đa khoa huyện Bố Trạch, Bệnh viện Đa khoa huyện Lệ Thủy và Bệnh viện Đa khoa huyện Tuyên Hóa giai đoạn 2019-2021.

Các biến số nghiên cứu: ngày vào viện, chẩn đoán vào viện, bệnh kèm theo, số ngày điều trị, ngày ra viện, bệnh chính khi ra viện, kết quả điều trị, bệnh chính y học cổ truyền, bệnh phụ y học cổ truyền, bệnh danh y học cổ truyền. Cách thức điều trị: dùng thuốc, không dùng thuốc, kết hợp.

Quy trình nghiên cứu: Các bệnh án nghiên cứu thỏa mãn tiêu chuẩn chọn và không vi phạm tiêu chuẩn loại trừ của các bệnh nhân điều trị nội trú tại 3 bệnh viện trong thời gian từ năm 2019 đến năm 2021 được thu thập đưa vào nghiên cứu. Bệnh án nghiên cứu được quy định theo mẫu chung thống nhất cho tất cả các bệnh nhân. Các thông tin cần thiết được điền vào bệnh án nghiên cứu theo mẫu này, đảm bảo thu thập đầy đủ các biến số và chỉ số nghiên cứu. Tổng kết và báo cáo kết quả.

Xử lý số liệu: Số liệu sau thu thập được xử lý bằng thuật toán thống kê y sinh học dưới sự hỗ trợ của phần mềm SPSS 20.0.

Đạo đức nghiên cứu: Nghiên cứu được thông qua bởi Hội đồng khoa học và Hội đồng đạo đức của Học viện Y Dược học Cổ truyền Việt Nam.

3. Kết quả

Sau khi thu thập và xử lý số liệu từ 13.833 bệnh án của bệnh nhân điều trị nội trú tại 3 bệnh viện trong thời gian từ tháng 1/2019 đến hết tháng 12/2021, chúng tôi nhận thấy, nhóm tuổi 50-79 chiếm tỷ lệ cao nhất (71,4%), tỷ lệ nam và nữ đi khám bệnh có tỷ lệ gần tương đương nhau.

Bảng 1. Phân bố 10 chứng thường gặp theo y học cổ truyền.

Chẩn đoán	Năm 2019 (1) n=4.391		2020 (2) n=4.412		2021 (3) n=4.224	
	Số lượng	Tỷ lệ (%)	Số lượng	Tỷ lệ (%)	Số lượng	Tỷ lệ (%)
Tọa cốt phong	1.554	35,4	1.356	30,7	1.031	24,4
Yêu thông	1.033	23,5	613	13,9	173	4,1
Chứng tý	560	12,8	1.191	27,0	1.857	44,0
Kiên thông	478	10,9	470	10,7	145	3,4
Bế cốt tý	255	5,8	417	9,5	440	10,4
Lạc chẩm	214	4,9	119	2,7	334	7,9
Khẩu nhân oa tà	101	2,3	90	2,0	124	2,9
Kiên tý	101	2,3	68	1,5	65	1,5
Hạc tất phong	95	2,2	88	2,0	55	1,3
Tổng	4.391	100,0	4.412	100,0	4.224	100,0
p	p(1, 2)>0,05		p(1, 3)<0,05		p(2, 3)<0,05	

Bảng 1 cho thấy, năm 2019 và 2020 chứng tọa cốt phong chiếm tỷ lệ lớn nhất, lần lượt là 35,4 và 30,7%, năm 2021 chứng bệnh chiếm tỷ lệ lớn nhất là chứng tý (44,0%). Sự khác biệt giữa năm 2019 với 2021, năm 2020 với 2021 có ý nghĩa thống kê.

Bảng 2. Chẩn đoán bệnh chính theo ICD-10.

Chẩn đoán	Năm 2019 (1) n=4.846		2020 (2) n=4.698		2021 (3) n=4.279	
	Số lượng	Tỷ lệ (%)	Số lượng	Tỷ lệ (%)	Số lượng	Tỷ lệ (%)
Chương I	11	0,23	12	0,26	9	0,21
Chương II	1	0,02	1	0,02	1	0,02
Chương III	6	0,12	5	0,11	8	0,19
Chương IV	43	0,89	5	0,11	8	0,19
Chương V	3	0,06	6	0,13	4	0,09
Chương VI	746	15,39	638	13,58	629	14,72
Chương VII	2	0,04	0	0,0	1	0,02
Chương VIII	57	1,18	71	1,51	30	0,7
Chương IX	149	3,07	84	1,79	77	1,8
Chương X	16	0,33	52	1,11	5	0,12
Chương XI	5	0,1	3	0,06	5	0,12
Chương XII	1	0,02	3	0,06	2	0,05
Chương XIII	3.775	77,9	3.789	80,65	3.461	80,86
Chương XIV	6	0,12	8	0,17	5	0,12
Chương XVII	7	0,14	7	0,15	2	0,05
Chương XVIII	18	0,37	14	0,3	32	0,75
Tổng	4.846	100,0	4.698	100,0	4.279	100,0
p	p(1, 2)<0,05		p(2, 3)<0,05		p(1, 3)<0,05	

ICD-10: Danh mục phân loại quốc tế về bệnh tật và các vấn đề liên quan đến sức khỏe lần thứ 10. Chương I: Bệnh nhiễm trùng và ký sinh trùng; Chương II: Khối u (Bướu tân sinh); Chương III: Bệnh máu, cơ quan tạo máu và các rối loạn liên quan cơ chế miễn dịch; Chương IV: Bệnh nội tiết, dinh dưỡng và chuyển hóa; Chương V: Rối loạn tâm thần và hành vi; Chương VI: Bệnh của hệ thần kinh; Chương VII: Bệnh mắt và phần phụ; Chương VIII: Bệnh tai và xương chũm; Chương IX: Bệnh của hệ tuần hoàn; Chương X: Bệnh hệ hô hấp; Chương XI: Bệnh hệ tiêu hóa; Chương XII: Bệnh da và mô dưới da; Chương XIII: Bệnh cơ xương khớp và mô liên kết; Chương XIV: Bệnh hệ tiết niệu và sinh dục; Chương XVII: Dị tật, dị dạng bẩm sinh và bất thường nhiễm sắc thể; Chương XVIII: Triệu chứng, dấu hiệu và những phát hiện lâm sàng, cận lâm sàng bất thường không phân loại ở nơi khác.

Bảng 2 cho thấy, các bệnh được chẩn đoán theo chương XIII chiếm tỷ lệ nhiều nhất qua các năm, tiếp theo là chương VI.

Bảng 3. Số ngày điều trị nội trú trung bình.

Ngày điều trị	Năm		
	2019 (1)	2020 (2)	2021 (3)
Số ngày điều trị nội trú trung bình ($\pm$ SD)	9,04 $\pm$ 2,08	9,92 $\pm$ 2,05	10,11 $\pm$ 2,62
Nhỏ nhất	2	1	1
Lớn nhất	20	20	20
p	p(1, 2)>0,05 p(2, 3)>0,05 p(1, 3)>0,05		

Bảng 3 cho thấy, số ngày điều trị nội trú trung bình tăng dần qua các năm 2019-2021 lần lượt là 9,04 $\pm$ 2,08, 9,92 $\pm$ 2,05 và 10,11 $\pm$ 2,62. Sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê.

Bảng 4. Kết quả điều trị tại 3 bệnh viện.

Kết quả điều trị	Năm 2019 (1) n=4.846		2020 (2) n=4.698		2021 (3) n=4.279	
	Số lượng	Tỷ lệ (%)	Số lượng	Tỷ lệ (%)	Số lượng	Tỷ lệ (%)
Ổn định ra viện	4.742	97,85	4.570	97,28	4.172	97,5
Chuyển tuyến	57	1,18	85	1,81	59	1,38
Chuyển điều trị	36	0,74	36	0,77	44	1,03
Xin về	9	0,19	6	0,13	4	0,09
Bỏ về	2	0,04	0	0,0	0	0,0
Tử vong	0	0,0	1	0,02	0	0,0
Tổng	4.846	100,0	4.698	100,0	4.279	100,0
p	p(1, 2)<0,05		p(2, 3)<0,05		p(1, 3)<0,05	

Kết quả bảng 4 cho thấy, kết quả điều trị “ổn định ra viện” chiếm tỷ lệ lớn nhất qua các năm 2019, 2020 và 2021 lần lượt là 97,85, 97,28 và 97,5%. Sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê.

4. Bàn luận

Nghiên cứu mô tả hồi cứu trên hồ sơ của 13.833 bệnh án của bệnh nhân điều trị nội trú tại 3 bệnh viện đa khoa huyện của tỉnh Quảng Bình trong thời gian từ tháng 1/2019 đến hết tháng 12/2021. Từ kết quả thu được chúng tôi nhận thấy, trong 10 chứng bệnh thường gặp nhất theo y học cổ truyền, chứng tọa cốt phong và chứng tý chiếm tỷ lệ lớn nhất. Tọa cốt phong là một trong những bệnh danh của chứng đau dây thần kinh tọa. Trong y học cổ truyền, bệnh này được liệt vào chứng tý hoặc thống, còn được gọi với một số tên khác như: tọa diễm phong, yêu cước thống, tọa cốt thống. Chứng tý là chứng kinh mạch bị bế tắc (tý là bế tắc) do ngoại tà xâm phạm làm khí huyết vận hành trong kinh mạch bị trở ngại gây cho bì phu cân cốt, cơ nhục, khớp xương đau nhức, bệnh nặng thì khớp sưng nóng, cử động khó khăn. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi có sự tương đồng với nghiên cứu của H.G. Pham (2020) [3] (chứng tý chiếm 29,72%).

Chẩn đoán bệnh chính theo ICD-10 trong 3 năm, chương XIII chiếm tỷ lệ lớn nhất, tiếp theo đó là chương VI. Các kết quả trên tương tự với mô hình bệnh tật phân loại theo ICD-10 của Bệnh viện Y học Cổ truyền Hà Đông (phổ biến nhất là chương XIII với 35,84% [3]. Mặc dù có sự giống nhau về mô hình bệnh tật nhưng tỷ lệ mắc các bệnh của nghiên cứu này thấp hơn so với nghiên cứu của chúng tôi, điều này có thể do tại Hà Nội tập trung nhiều bệnh viện chuyên khoa đầu ngành nên tỷ lệ điều trị tại Bệnh viện Y học Cổ truyền Hà Đông thấp hơn [3]. Kết quả nghiên cứu “Mô hình bệnh tật của bệnh nhân điều trị nội trú tại Bệnh viện Y học Cổ truyền Bảo Lộc” giai đoạn 2008-2012 cũng cho thấy các bệnh chương XIII đứng đầu với 45,3% [4].

Trong nghiên cứu này, tổng số ngày điều trị nội trú trung bình tăng qua từng năm, lần lượt là 9,04 $\pm$ 2,08, 9,92 $\pm$ 2,05 và 10,11 $\pm$ 2,62 ngày. Nghiên cứu của H.G. Pham (2020) [3] cho thấy số ngày điều trị trung bình là 16,8. Kết quả này cao hơn so với nghiên cứu của chúng tôi, nguyên nhân có thể do địa bàn nghiên cứu của H.G. Pham (2020) [3] ở Hà Nội với tỷ lệ người bệnh tập trung hơn. Theo thống kê y tế năm 2011, số ngày điều trị nội trú trung bình của một bệnh nhân nội trú là 6,83, trong đó tuyến trung ương là 9,41 ngày, y tế các ngành là 6,55 ngày và tuyến y tế địa phương là 6,61 ngày [5]. Như vậy, có thể thấy thời gian nằm viện ở các bệnh viện trong nghiên cứu của chúng tôi có phần tương đồng với các nghiên cứu trên.

5. Kết luận

Kết quả nghiên cứu cho thấy, chứng tọa cốt phong được chẩn đoán bệnh thường gặp nhất vào năm 2019 và 2020 (tương ứng với 35,4 và 30,7%). Tuy nhiên đến năm 2021, chứng tý chiếm phần lớn trong mô hình bệnh tật với 44,0%. Chiều theo ICD-10, các bệnh chính và một số bệnh kèm theo thuộc chương XIII (bệnh hệ cơ xương khớp và mô liên kết) chiếm tỷ lệ lớn nhất. Tổng số ngày điều trị trung bình trong 3 năm dao động từ 7 đến 12 ngày. Kết quả điều trị chiếm phần lớn là “ổn định cho ra viện” với tỷ lệ qua các năm từ 2019 đến 2021 lần lượt là 97,85, 97,28 và 97,5%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Y.N. Do (2004), *Research on Disease Structure of Officers and Soldiers Treated at Hospital 198 Ministry of Public Security*, Scientific Research Project at Ministerial Level, Hanoi (in Vietnamese).
- [2] Ministry of Health (2017), *Decision No. 6061/QĐ-BYT 2017 Dated 29 December 2017 on Promulgating a Common Code List for Medical Examination, Treatment and Health Insurance Payment* (version 5) (in Vietnamese).
- [3] H.G. Pham (2020), *Disease Patterns of Inpatients and Current Situation of Resources at Ha Dong Traditional Medicine Hospital*, Master Thesis in Medicine, Vietnam University of Traditional Medicine (in Vietnamese).
- [4] D.T. Bui (2013), *Research on Trends in Disease Structure of Inpatient Patients and Organisation of Activities of Bao Loc Traditional Medicine Hospital in The Period 2008-2012*, Specialisation Thesis Level II, Hanoi Medical University (in Vietnamese).
- [5] Ministry of Health (2014), *Decision No. 4664/QĐ-BYT Dated November 7, 2014 on Promulgating a Set of Model Medicinal Plant Paintings for Use in Medical Examination and Treatment Facilities Using Traditional Medicine* (in Vietnamese).

Ảnh hưởng của một số loại phân hữu cơ đến sinh trưởng, năng suất và chất lượng dưa chuột (*Cucumis sativus* L.) trồng tại Vĩnh Phúc trong điều kiện nhà lưới

Phan Thị Thu Hiền^{1*}, Nguyễn Thị Ngọc Dinh^{2*}, Lê Thị Tuyết Châm²

¹Khoa Sinh - Kỹ thuật Nông nghiệp, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2, đường Nguyễn Văn Linh, phường Xuân Hoà, TP Phúc Yên, tỉnh Vĩnh Phúc, Việt Nam

²Khoa Nông học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam, thị trấn Trâu Quỳ, huyện Gia Lâm, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 20/2/2024; ngày chuyển phân biên 23/2/2024; ngày nhận phân biên 9/3/2024; ngày chấp nhận đăng 20/3/2024

Tóm tắt:

Nghiên cứu được tiến hành nhằm đánh giá ảnh hưởng của các loại phân hữu cơ đến sinh trưởng, năng suất và chất lượng của giống dưa chuột Khassib RZ F1 tại tỉnh Vĩnh Phúc. Thí nghiệm một nhân tố được bố trí theo kiểu khối ngẫu nhiên đầy đủ với 3 lần nhắc lại, gồm 4 công thức thí nghiệm để bón cho 1 ha, gồm: (1) Đối chứng: Sử dụng 100% phân bón vô cơ (150 kg N + 90 kg P₂O₅ + 150 kg K₂O); (2) CT1: 25% phân vô cơ + 22,5 tấn phân gà ủ hoai mục; (3) CT2: 25% phân vô cơ + 18 tấn phân trùn quế; (4) CT3: 25% phân vô cơ + 3750 kg phân hữu cơ vi sinh Quế Lâm 01. Kết quả cho thấy, khi sử dụng phân hữu cơ trùn quế (CT2) đem lại năng suất cao nhất. Tỷ lệ đậu quả ở CT2 đạt cao nhất (68,55%), CT3 sử dụng phân hữu cơ vi sinh Quế Lâm 01 có tỷ lệ đậu quả thấp nhất (59,71%). CT2 đạt số quả/cây cao nhất (4,82 quả/cây), năng suất thực thu đạt cao nhất ở CT2 (15,96 kg/ô), thấp nhất ở công thức đối chứng (11,39 kg/ô). Hàm lượng nitrate trong dưa chuột ở các công thức thí nghiệm đều ở ngưỡng an toàn theo quy định. Công thức bón phân trùn quế (CT2) cũng cho các chỉ tiêu chất lượng của dưa chuột tốt như đặc ruột và ăn rất giòn. CT2 bón 25% phân vô cơ và 18 tấn phân trùn quế là phù hợp nhất đối với sinh trưởng, phát triển, năng suất và chất lượng giống dưa chuột Khassib RZ F1 tại tỉnh Vĩnh Phúc.

Từ khoá: dưa chuột, năng suất, phân hữu cơ, sinh trưởng, tỉnh Vĩnh Phúc.

Chỉ số phân loại: 4.1

1. Đặt vấn đề

Dưa chuột (*Cucumis sativus* L.) thuộc họ *Cucurbitaceae*, bao gồm 90 chi và 750 loài. Dưa chuột là loại rau ăn quả có giá trị kinh tế cao, loại thực phẩm giàu dinh dưỡng được sử dụng tại nhiều nước và có giá trị xuất khẩu cao. Dưa chuột là một trong những loài rau được trồng ở vùng nhiệt đới lâu đời nhất và được trồng ở hầu hết các quốc gia có khí hậu nhiệt đới [1]. Ngoài ra, quả dưa chuột còn có tác dụng thanh lọc cơ thể, giảm căng thẳng, giúp sáng da [2].

Hiện nay, dân số thế giới tiếp tục tăng, do vậy nhu cầu lương thực, thực phẩm thế giới tăng nhanh. Trong quá trình sản xuất, việc sử dụng phân bón hóa học giúp tăng năng suất cây trồng nhưng chất lượng của sản phẩm không được quan tâm. Việc sản xuất và tiêu thụ các sản phẩm này làm ảnh hưởng đến sức khỏe và ô nhiễm môi trường, do vượt quá nồng độ nitrat và oxalate. Ngoài ra, phân bón hóa học đã và đang gây ô nhiễm và giảm độ phì nhiêu của đất, hệ thực vật và động vật. Việc sử dụng phân bón hóa học còn gây xói mòn và không còn khả năng duy trì năng suất cây trồng của đất. Việc tăng lượng bón phân hữu cơ đã làm tăng khả năng sản xuất vitamin C, protein, đường và giảm tích lũy nitrat trong quả dưa chuột [3, 4]. Các nước trên thế giới khuyến

khích sử dụng phân bón sinh học và hữu cơ để phát triển nông nghiệp bền vững [5].

Dưa chuột là loài thực vật ưa nhiệt, phát triển tối ưu ở nhiệt độ trên 20°C. Dưa chuột hiện nay được trồng để cung cấp với nhu cầu thị trường rất lớn. Với hàm lượng chất dinh dưỡng cao và nhiều lợi ích khác, dưa chuột đang được người dân sử dụng nhiều trong bữa ăn hàng ngày. Vì vậy, cây dưa chuột đang từng bước được canh tác với diện tích ngày càng lớn trên địa bàn tỉnh Vĩnh Phúc. Hiện nay, việc sử dụng phân bón NPK tổng hợp, chất điều hoà sinh trưởng, phân vi lượng đang có ảnh hưởng trực tiếp đến chất lượng, năng suất của cây trồng nói chung và dưa chuột nói riêng. Ngoài ra, những tồn dư phân bón sẽ được tích trữ trong cây, quả và ảnh hưởng không nhỏ đến sức khỏe của con người. Vai trò và tầm quan trọng của phân bón hữu cơ trong sản xuất bền vững đã được khẳng định [6]. Nhiều nghiên cứu cho thấy, phân bón hữu cơ có thể thay thế phân bón hóa học một phần hoặc toàn bộ trong sản xuất rau [7].

Thực phẩm hữu cơ đang là sản phẩm ngành nông nghiệp hướng đến, nhằm đảm bảo các sản phẩm thân thiện với môi trường, có lợi cho sức khỏe con người. Tuy nhiên, những nghiên cứu khảo sát việc sử dụng phân bón hữu cơ tác động

*Tác giả liên hệ: Email: phanthithuhien@hpu2.edu.vn, ntndinh@vnua.edu.vn

Effects of some types of organic fertilisers on growth, yield and quality of *Cucumis sativus* L. grown in Vinh Phuc province under greenhouse conditions

Thi Thu Hien Phan^{1*}, Thi Ngoc Dinh Nguyen^{2*},
Thi Tuyen Cham Le²

¹Faculty of Biology and Agricultural Engineering, Hanoi Pedagogical University 2,
Nguyen Van Linh Street, Xuan Hoa Ward, Phuc Yen City, Vinh Phuc Province, Vietnam

²Faculty of Agronomy, Vietnam National University of Agriculture,
Trau Quỳ Town, Gia Lam District, Hanoi, Vietnam

Received 20 February 2024; revised 9 March 2024; accepted 20 March 2024

Abstract:

The study was conducted to evaluate the effects of organic fertilisers on the growth, yield, and quality of the Khassib RZ F1 cucumber variety in Vinh Phuc. The one-factor experiment was arranged in a completely randomised block design with 3 replications, including 4 treatments (fertilise for 1 hectare) including: (1) Control: Use 100% inorganic fertiliser (150 kg N + 90 kg P₂O₅ + 150 kg K₂O); (2) CT1: 25% inorganic fertiliser + 22.5 tons of composted chicken manure; (3) CT2: 25% inorganic fertiliser + 18 tons of vermicompost; (4) CT3: 25% inorganic fertiliser + 3750 kg of Que Lam 01 microbial organic fertiliser. The results showed that using earthworm organic fertiliser (CT2) had the highest actual yield. The fruiting rate in CT2 reached the highest at 68.55%, CT3 using Que Lam 01 microbial organic fertiliser had the lowest fruiting rate of 59.71%. CT2 achieved the highest number of fruits plant⁻¹, 4.82 fruits plant⁻¹. The actual yield was highest in CT2 (15.96 kg plot⁻¹), and lowest in the control treatment (11.39 kg plot⁻¹). The nitrate accumulated in cucumbers in all treatments was below the threshold. The vermicompost fertiliser treatment (CT2) also gave good quality indicators of cucumbers such as thick intestine and very crispy taste. From these results, CT2 treatment with 25% inorganic fertiliser and 18 tons of vermicompost is suitable for the growth, development, yield, and quality of the Khassib RZ F1 cucumber variety in Vinh Phuc province.

Keywords: *Cucumis sativus* L., growth, organic fertiliser, Vinh Phuc province, yield.

Classification number: 4.1

đến một số chỉ tiêu sinh trưởng, phát triển của giống dưa chuột Khassib RZ F1 trên địa bàn tỉnh Vĩnh Phúc chưa được triển khai, mặc dù diện tích trồng dưa chuột trên địa bàn đã tăng so với các năm trước. Vì vậy, mục đích của nghiên cứu này nhằm đánh giá thay thế lượng phân vô cơ bằng các loại phân hữu cơ và xác định được liều lượng phân hữu cơ phù hợp để tăng sự sinh trưởng, phát triển và nâng cao chất lượng của giống dưa chuột Khassib RZ F1.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Giống dưa chuột Khassib RZ F1 được cung cấp bởi Công ty Rijk Zwaan Vietnam. Đây là giống dưa chuột có khả năng chịu lạnh tốt, thích nghi tốt trong điều kiện thiếu ánh sáng vào mùa mưa, năng suất cao và ổn định.

Phân bón sử dụng trong thí nghiệm: Đạm ure (46% N), supe lân (17% P₂O₅), kali sunphat (60% K₂O), phân hữu cơ vi sinh Quế Lâm 01 (tỷ lệ N:P:K là 3:1:1, hữu cơ 15%, vi sinh vật cố định đạm 1×10⁶ CFU/g, vi sinh vật phân giải lân 1×10⁶ CFU/g, vi sinh vật phân giải xenlulose 1×10⁶ CFU/g) [7], phân trùn quế (0,62% N, 2,25% P₂O₅, 0,75% K₂O và 28% hữu cơ tổng số) [8], phân gà ủ hoai mục (lượng phân gà ủ hoai thích hợp cho dưa chuột là 30 tấn/ha) [9].

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm một nhân tố được bố trí theo kiểu khối ngẫu nhiên đầy đủ với 4 công thức với lượng bón trên 1 ha như sau: (1) Đối chứng: Sử dụng 100% phân bón vô cơ (150 kg N + 90 kg P₂O₅ + 150 kg K₂O) [10]; (2) CT1: 25% phân vô cơ + 22,5 tấn phân gà ủ hoai mục; (3) CT2: 25% phân vô cơ + 18 tấn phân trùn quế; (4) CT3: 25% phân vô cơ + 3750 kg hữu cơ vi sinh Quế Lâm 01; 3 lần nhắc lại, mỗi lần nhắc lại là 1 ô thí nghiệm với diện tích 6 m² trong vụ thu đông năm 2022 tại Vườn thực nghiệm Khoa Sinh - Kỹ thuật Nông nghiệp, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2.

Dưa chuột được trồng với khoảng cách hàng cách hàng 60 cm, cây cách cây 30 cm, trồng hàng đôi.

2.2.2. Các chỉ tiêu theo dõi

Các chỉ tiêu sinh trưởng, phát triển, các yếu tố cấu thành năng suất và năng suất: Thời gian sinh trưởng (ngày) (thời gian từ gieo đến nảy mầm (70%), thời gian xuất hiện lá thật, thời gian xuất hiện tua cuốn, thời gian phân cành, thời gian ra hoa cái đầu tiên, thời gian thu quả đợt 1, tổng thời gian sinh trưởng).

Chỉ tiêu các yếu tố cấu thành năng suất và năng suất (tỷ lệ đậu quả, số quả/cây, khối lượng quả trung bình, năng suất cá thể (g/cây), năng suất lý thuyết (kg/ô thí nghiệm) và năng suất thực thu (kg/ô thí nghiệm) của cây dưa chuột Khassib RZ F1.

Chỉ tiêu về chất lượng: Chiều dài quả, đường kính quả, ruột quả, độ giòn, độ Brix và hàm lượng NO_3^- .

2.3. Xử lý số liệu

Số liệu thu thập được xử lý thống kê theo phương pháp phân tích phương sai (ANOVA). So sánh sự sai khác giữa các giá trị trung bình bằng giá trị sai khác nhỏ nhất có ý nghĩa (LSD) bằng phần mềm thống kê IRRISTAT 5.0.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Ảnh hưởng của một số loại phân hữu cơ thay thế đến các đặc điểm sinh trưởng và phát triển của giống dưa chuột Khassib RZ F1

Dưa chuột là cây trồng hàng năm, thời gian sinh trưởng của cây được tính từ khi gieo hạt đến khi thu hoạch kết thúc. Để khảo sát khả năng sinh trưởng của cây dưa chuột Khassib RZ F1 cần dựa vào một số đặc tính nông sinh học đặc thù [11]. Mỗi giống dưa khác nhau sẽ có đặc điểm nông sinh học mỗi thời kỳ khác nhau. Thời gian từ gieo đến mọc là giai đoạn hạt chuyển từ trạng thái ngủ nghỉ sang trạng thái nảy mầm, thời kỳ này cây chủ yếu sử dụng chất dinh dưỡng dự trữ trong hạt. Ở giai đoạn này cần thiết phải giữ ẩm cho đất để tạo điều kiện thuận lợi cho hạt nảy mầm.

Để đánh giá một giống, cần dựa vào khả năng sinh trưởng và phát triển của giống đó. Giống cần thích nghi được với điều kiện thời tiết, sinh trưởng nhanh và cho năng suất cao. Thời gian sinh trưởng, phát triển của giống dưa chuột Khassib RZ F1 qua các giai đoạn được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của một số loại phân hữu cơ đến thời gian sinh trưởng, phát triển của dưa chuột Khassib RZ F1.

Công thức	Thời gian nảy mầm (ngày)	Thời gian ra 3-4 lá thật (ngày)	Thời gian ra tua cuốn (ngày)	Thời gian phân cành (ngày)	Thời gian ra hoa cái đầu tiên (ngày)	Thời gian thu quả đợt 1 (ngày)	Tổng thời gian sinh trưởng (ngày)
Đối chứng	6	13	17	24	29	41	68
CT1	7	16	20	23	33	45	70
CT2	5	15	17	21	27	40	65
CT3	5	15	18	25	31	45	67

Kết quả bảng 1 cho thấy, tất cả các công thức thí nghiệm có thời gian nảy mầm dao động trong khoảng 5-7 ngày. CT2 và CT3 mọc mầm vào 5 ngày sau khi làm bầu. Sau 7 ngày thì tất cả các giống đã xuất hiện 2 lá mầm. Công thức đối chứng có thời gian xuất hiện 3 lá thật sớm nhất (13 ngày sau mọc mầm). CT2 và CT3 bắt đầu xuất hiện 3 lá thật cùng 15 ngày sau mọc mầm. Đây là thời kỳ cây phát triển mạnh mẽ ở thời kỳ cây con phát triển dinh dưỡng một cách toàn diện. Giống ra 3-4 lá thật sớm nhất thì cây sẽ phát triển khỏe nhất ở thời kỳ này. Sau 17-20 ngày, cây bắt đầu xuất hiện tua cuốn, trong đó công thức xuất hiện tua cuốn muộn nhất là CT1 và sớm nhất là đối chứng.

Thời kỳ phân cành phụ thuộc nhiều vào đặc tính di truyền do giống quy định, ngoài ra, điều kiện dinh dưỡng cũng ảnh hưởng đến quá trình phân cành của giống dưa chuột Khassib RZ F1. Kết quả thu được cho thấy, giống dưa chuột Khassib RZ F1 bước vào thời kỳ phân cành sớm nhất là 21 ngày sau khi mọc mầm (CT2) và phân cành muộn nhất là 25 ngày sau mọc mầm (CT3). CT2 có thời gian từ khi mọc mầm đến thời gian ra hoa sớm nhất (27 ngày), CT1 ra hoa muộn nhất (33 ngày). Nguyên nhân của hiện tượng này có thể do điều kiện dinh dưỡng và điều kiện chiếu sáng tác động lên thời gian ra hoa của giống dưa chuột Khassib RZ F1.

Thời gian thu hoạch là một yếu tố quan trọng quyết định hiệu quả canh tác cây trồng. Kết quả thu được cho thấy, công thức đối chứng và CT1 có khoảng cách giữa thời gian ra hoa cái đầu và thu quả đợt 1 là 12 ngày, CT2 có khoảng thời gian này là 13 ngày, CT3 là 14 ngày. Giống dưa chuột Khassib RZ F1 là giống ngắn ngày, có tổng thời gian sinh trưởng, phát triển từ 65 (CT2) đến 70 ngày (CT1). CT2 có thời gian sinh trưởng ngắn nhất (65 ngày), tiếp theo là CT3 (67 ngày), đối chứng (68 ngày) và muộn nhất là CT1 (70 ngày).

3.2. Ảnh hưởng của một số loại phân hữu cơ đến yếu tố chất lượng của giống dưa chuột Khassib RZ F1

Dưa chuột ngoài dùng để làm thực phẩm hàng ngày còn là một loại nông sản xuất khẩu mang lại giá trị kinh tế cao. Vì vậy, chất lượng quả dưa chuột luôn giữ vai trò quan trọng. Để bước đầu có kết quả đánh giá về chất lượng quả, một số chỉ tiêu như chiều dài quả, đường kính quả, ruột quả và độ giòn đã được thống kê. Kết quả được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của một số loại phân hữu cơ đến một số chỉ tiêu chất lượng của dưa chuột.

Công thức	Chiều dài quả (cm)	Đường kính quả (cm)	Đặc điểm ruột quả	Độ giòn
Đối chứng	15,61 ^b	3,67 ^a	Đặc	Ít giòn
CT1	14,81 ^b	3,53 ^a	Ít đặc	Giòn
CT2	20,77 ^a	3,38 ^a	Đặc	Rất giòn
CT3	20,10 ^a	3,33 ^a	Đặc	Ít giòn
CV%	5,23	6,41		
LSD _{0,05}	1,68	0,43		

Các giá trị trung bình cùng cột mang mũ cùng chữ cái là sai khác không có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95% và ngược lại các chữ cái khác nhau là sai khác có ý nghĩa.

Kết quả bảng 2 cho thấy, công thức có chiều dài quả lớn nhất là CT2 (20,77 cm) sai khác không có ý nghĩa so với CT3 (20,10 cm) và sai khác có ý nghĩa so với đối chứng (15,61 cm) và CT1. Chiều dài quả ngắn nhất là CT1 (14,81 cm). Đường kính quả dao động từ 3,33 (CT 3) đến 3,67 cm (đối chứng). Quả dưa chuột ở các công thức đều được đánh giá đặc ruột, có độ giòn và phù hợp với nhu cầu thị trường, đặc biệt là CT2. Trong sản xuất dưa chuột theo hướng hữu cơ, quy tắc không sử dụng thuốc bảo vệ thực vật nên không có sự tồn dư của các chất này trong quả. Đây là cơ sở tạo ra các sản phẩm đảm bảo an toàn vệ sinh thực phẩm. Một trong các yếu tố thường được quan tâm trong sản xuất dưa chuột để đảm bảo an toàn là hàm lượng nitrat tồn dư trong quả khi thu hoạch ở ngưỡng cho phép. Theo quy định của Tổ chức Y tế thế giới, hàm lượng nitrat cho phép trong quả dưa chuột không được vượt quá 150 mg/kg quả.

Bảng 3. Ảnh hưởng của một số loại phân hữu cơ đến độ Brix và hàm lượng nitrat trong quả dưa chuột.

Công thức	Độ Brix (%)	Nitrat (mg/kg)
Đối chứng	5,28	23,74
CT1	5,26	15,93
CT2	5,22	13,09
CT3	5,30	16,57

Kết quả bảng 3 cho thấy, hàm lượng nitrat trong các công thức đều nằm trong ngưỡng cho phép của Tổ chức Y tế thế giới khi đều dưới 150 mg/kg. Hàm lượng nitrat trong quả của công thức đối chứng cao nhất (23,74 mg/kg) và thấp nhất là CT2 (13,09 mg/kg quả).

Độ Brix là tỷ lệ phần trăm khối lượng các chất hoà tan so với khối lượng nước mía hay dung dịch đường là chỉ tiêu quan trọng trong đánh giá chất lượng quả. Các công thức có độ Brix xấp xỉ nhau, dao động 5,22-5,30%. Công thức có Brix cao nhất là CT3 (5,30%). Kết quả này tương đồng

với nghiên cứu của G. Neata và cs (2016) [12], công bố của nhóm cho thấy, khi tăng tỷ lệ phân bón vô cơ dẫn đến hàm lượng nitrat trong quả tăng.

3.3. Ảnh hưởng của loại phân hữu cơ đến một số yếu tố cấu thành năng suất và năng suất của giống dưa chuột Khassib RZ F1

Năng suất dưa chuột được cấu thành bởi các yếu tố: số quả/cây, khối lượng trung bình quả khi thu hoạch, tỷ lệ đậu quả. Kết quả nghiên cứu được thể hiện ở bảng 4.

Bảng 4. Năng suất và các yếu tố cấu thành năng suất của giống dưa chuột Khassib RZ F1.

Công thức	Tỷ lệ đậu quả (%)	Số quả trên cây (quả/cây)	Khối lượng trung bình của quả (g)	Năng suất cá thể (g/cây)	Năng suất lý thuyết (kg/ô thí nghiệm)	Năng suất thực thu (kg/ô thí nghiệm)
Đối chứng	59,98 ^b	4,37 ^{ab}	174,52 ^c	738,46 ^c	14,89 ^b	11,39 ^b
CT1	63,37 ^{ab}	4,44 ^{ab}	176,63 ^c	778,52 ^b	15,69 ^b	11,59 ^b
CT2	68,55 ^a	4,82 ^a	197,42 ^a	953,55 ^a	18,94 ^a	15,96 ^a
CT3	59,71 ^b	4,16 ^b	187,32 ^b	783,46 ^b	15,66 ^b	11,84 ^b
CV%	6,51	6,20	2,4	7,32	7,28	8,18
LSD _{0,05}	7,74	0,62	7,48	8,75	2,26	2,21

Các giá trị trung bình cùng cột mang mũ cùng chữ cái là sai khác không có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95% và ngược lại các chữ cái khác nhau là sai khác có ý nghĩa.

Kết quả bảng 4 cho thấy, CT2 cho tỷ lệ đậu quả và số quả cao nhất nhưng sai khác không có ý nghĩa thống kê so với CT1; CT3 có tỷ lệ đậu quả và số quả thấp nhất lần lượt là 59,71% và 4,16 quả/cây. CT2 có tỷ lệ đậu quả cao hơn 14,28% so với đối chứng. Số quả trên cây của CT2 đạt cao nhất nhưng sai khác không có ý nghĩa so với đối chứng.

Khối lượng trung bình quả là yếu tố quyết định trực tiếp đến năng suất của cây. Sự biến động về khối lượng quả giữa các công thức không lớn, dao động trong khoảng 174,52-197,42 g, CT2 có khối lượng trung bình quả lớn nhất (197,42 g/quả) với sai khác có ý nghĩa so với các công thức thí nghiệm khác.

Năng suất cá thể của dưa chuột đạt cao nhất ở CT2, sai khác có ý nghĩa so với các công thức còn lại, cao hơn 29,13% so với đối chứng. Năng suất lý thuyết thể hiện tiềm năng cho năng suất tối đa của từng giống và phụ thuộc vào các yếu tố như: mật độ gieo trồng, khối lượng trung bình quả và số quả hữu hiệu trên cây. Dựa vào đó có thể đánh giá được khả năng cho năng suất của các công thức từ đó tác động các biện pháp kỹ thuật nhằm khai thác tối đa tiềm năng cho năng suất của giống. Năng suất lý thuyết của các thí nghiệm dao động 14,89-18,94 kg/ô thí nghiệm. Công thức có năng suất cao nhất là CT2 (18,94 kg/ô thí nghiệm)

và công thức có năng suất thấp nhất là đối chứng (14,89 kg/ô thí nghiệm).

Năng suất thực thu là tiêu chí đánh giá phẩm chất hiệu quả của giống và các biện pháp kỹ thuật tác động trong quá trình sản xuất. Đây là kết quả cuối cùng của quá trình trồng trọt, là chỉ tiêu quan trọng nhất trong việc xác định hiệu quả kinh tế. Kết quả bảng 4 cho thấy, năng suất thực thu của các công thức thí nghiệm dao động 11,39-15,96 kg/ô thí nghiệm. Công thức có năng suất thực thu cao nhất là CT2 (15,96 kg/ô thí nghiệm), sai khác có ý nghĩa so với các công thức còn lại, cao hơn 40,12% so với công thức đối chứng.

Kết quả của chúng tôi khi nghiên cứu trên giống dưa chuột Khassib RZ F1 cao hơn so với kết quả nghiên cứu của T.T. Thiêm và cs (2019) [7], khi tiến hành thí nghiệm gồm 4 công thức: 100% phân vô cơ, 75% phân vô cơ + 25% phân hữu cơ vi sinh, 50% phân vô cơ + 50% phân hữu cơ vi sinh và 25% phân vô cơ + 75% phân hữu cơ vi sinh. Kết quả thí nghiệm cho thấy, khi thay thế từ 25 đến 75% lượng phân vô cơ bón bằng phân hữu cơ vi sinh đã ảnh hưởng đến thời gian sinh trưởng, chiều cao cây dẫn đến ảnh hưởng khối lượng chất khô và cuối cùng ảnh hưởng đến năng suất, chất lượng quả của cả dưa chua và dưa chuột ở 4 địa điểm trong vụ xuân năm 2018. Lượng phân hữu cơ vi sinh thay thế 25% phân vô cơ bón giúp cây dưa chua và dưa chuột sinh trưởng tốt và cho năng suất cao hơn các mức thay thế khác, cao hơn cả khi bón 100% phân vô cơ ở mức ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Tuy nhiên, kết quả nghiên cứu này thể hiện khối lượng quả dưa chuột dao động 119-145 g/quả, thấp hơn so với kết quả thu được trên giống dưa chuột Khassib RZ F1 (174,52-197,42 g/quả). Có sự khác biệt này do bản chất di truyền của các giống khác nhau, điều kiện thổ nhưỡng, khí hậu canh tác khác nhau dẫn đến năng suất khác nhau. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Y. Geng và cs (2019) [13], phân vô cơ chứa lượng lớn N dễ hấp thụ, cây trồng có thể sử dụng ngay sau khi bón, trong khi đó phân hữu cơ cần có thời gian để giải phóng và cung cấp N trong suốt thời gian sinh trưởng của cây trồng nên việc bón kết hợp phân vô cơ với phân hữu cơ là biện pháp hiệu quả tăng năng suất cây trồng.

4. Kết luận

Kết quả nghiên cứu cho thấy, việc thay thế kết hợp 25% phân vô cơ với phân hữu cơ đem lại hiệu quả tích cực đến sự sinh trưởng, phát triển và cho năng suất cao với dưa chuột. Đặc biệt, khi sử dụng phân hữu cơ trùn quế, đem lại năng suất cao nhất. Tỷ lệ đậu quả ở CT2 đạt cao nhất 68,55%, CT3 có tỷ lệ đậu quả thấp nhất 59,71%. CT2 đạt số quả/cây cao nhất 4,82 quả/cây. Năng suất lý thuyết và năng suất thực tế ở CT2 đạt cao nhất trong tất cả các công thức thí nghiệm, lần lượt là 18,94 và 15,96 kg/ô thí nghiệm. Các công thức thí nghiệm đều có hàm lượng nitrat dưới ngưỡng cho phép. CT2 cho chất lượng dưa chuột đặc ruột và rất giòn. Kết quả nghiên cứu đã chỉ ra, CT2 bón 25% phân vô cơ kết hợp với 18 tấn phân trùn quế cho 1 ha là phù hợp nhất đối với sinh

trưởng, phát triển, năng suất và chất lượng giống dưa chuột Khassib RZ F1 trồng tại tỉnh Vĩnh Phúc.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được thực hiện tại Phòng Thí nghiệm Di truyền học, Khoa Sinh - Kỹ thuật Nông nghiệp và Vườn thực nghiệm của Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] S. Huang, R. Li, Z. Zhang, et al. (2009), "The genome of the cucumber, *Cucumis sativus* L.", *Nature Genetics*, **41**(12), pp.1275-1281, DOI: 10.1038/ng.475.
- [2] W.F.H.I.Q. Mohammed (2017), "Effect of bio-organic fertilisation in some nutrients availability, growth and yield of cucumber (*Cucumis sativus* L.)", *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science*, **10**(10), pp.13-17, DOI: 10.9790/2380-1010041317.
- [3] Z. Hong-mei, J. Hai-jun, D. Xiao-tao (2014), "Effects of application of organic and inorganic fertilizers on the growth, yield quality of cucumber in greenhouse", *Journal of Plant Nutrition and Fertilizer*, **20**(1), pp.247-253, DOI: 10.11674/zwyf.2014.0128.
- [4] N.T. Loan, T.T. Thiêm (2022), "Effects of increase in organic fertilizers and reduction in chemical fertilizers on the plant growth, fruit yield and quality of cucumber (*Cucumis sativus* L.)", *CTU Journal of Science*, **58**(6B), pp.88-97, DOI: 10.22144/ctu.jvn.2022.247 (in Vietnamese).
- [5] R. Hayat, S. Ali, U. Amara, et al. (2010), "Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: A review", *Ann. Microbiol.*, **60**, pp.579-598, DOI: 10.1007/s13213-010-0117-1.
- [6] G. Bhuvaneswar, S. Reetha, R.Sivaranjani, et al. (2014), "Effect of AM fungi and Trichoderma species as stimulations of growth and morphological character of chilli (*Capsicum annuum* L.)", *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, **3**(3), pp.447-455.
- [7] T.T. Thiêm, P.V. Cuong, T.T.M. Hang, et al. (2019), "Effect of the partial replacement of inorganic fertilizer by using microbio-organic fertilizer on the growth and yield of tomato and cucumber", *Vietnam Journal of Agriculture Science*, **17**(11), pp.901-908 (in Vietnamese).
- [8] T.T.P. Thu, T.T. Thiêm, P.X. Pa (2023), "Effects of combining soil and foliar fertilization on growth, development and yield of eggplant", *Vietnam Journal of Agriculture Science*, **21**(3), pp.279-288 (in Vietnamese).
- [9] P.T. Dung, D.T. Huong (2012), "Effect of compost and micro-organic fertilizers to growth, development yield of cucumber produced following organic production direction at Gia Lam, Hanoi", *Vietnam Journal of Agriculture Science*, **10**(2), pp.199-206 (in Vietnamese).
- [10] N.N. Ha (2006), *Fertilizer for Plants*, Hanoi Agricultural Publishing House, 192pp.
- [11] T.T. Cuc, H.H. An, N.T.B. Ha (2000), *Vegetable Plants*, Hanoi Agricultural Publishing House, 258pp (in Vietnamese).
- [12] G. Neata, G. Hoza, R.I. Teodorescu, et al. (2016), "Phosphorus, potassium and nitrate contents in fruit of pickling cucumbers grown in a high tunnel", *Not. Bot. Horti. Agrobiol.*, **44**(2), pp.541-547, DOI: 10.15835/nbha44210354.
- [13] Y. Geng, G. Cao, L. Wang, et al. (2019), "Effects of equal chemical fertilizer substitutions with organic manure on yield, dry matter, and nitrogen uptake of spring maize and soil nitrogen distribution", *PLOS ONE*, **14**(7), DOI: 10.1371/journal.pone.0219512.

Ảnh hưởng của thời vụ đồn nuôi hom, bón phân và tia cạnh đến năng suất hom giống Sờ cam (*Camellia oleifera* Abel)

Lê Tất Khang*, Phạm Văn Ngân, Nguyễn Văn Lam, Nguyễn Phương Tùng,
Đinh Thị Ngọc, Lê Thành Phụng, Nông Quang Thiện

Viện Nghiên cứu và Phát triển Vùng, Bộ Khoa học và Công nghệ,
70 Trần Hưng Đạo, phường Trần Hưng Đạo, quận Hoàn Kiếm, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 17/4/2024; ngày chuyển phản biện 18/4/2024; ngày nhận phản biện 25/4/2024; ngày chấp nhận đăng 12/5/2024

Tóm tắt:

Mục tiêu: Nghiên cứu ảnh hưởng của việc đồn nuôi hom, bón phân NPK (16-16-8) và cắt, tia cạnh sau đồn đến năng suất hom giống Sờ cam nhằm hoàn thiện quy trình sản xuất hom giống Sờ cam để nhân giống bằng phương pháp giâm hom. Nghiên cứu được tiến hành từ năm 2022 đến 2023 tại vườn giống gốc Sờ cam (*Camellia oleifera* Abel) 3 tuổi, trồng tại thị trấn Sông Cầu, huyện Đồng Hỷ, tỉnh Thái Nguyên. Các thí nghiệm được bố trí theo khối ngẫu nhiên, 3 lần nhắc lại. Kết quả cho thấy, thời vụ đồn sản xuất hom của giống Sờ cam tốt nhất ở thời điểm từ ngày 30/7 đến ngày 15/8, cho năng suất hom tương ứng là 112,22 và 123,44 hom/cây; lượng phân bón 1,6 và 1,8 kg NPK (16-16-8)/cây cho năng suất hom cao nhất, đạt lần lượt là 120,56 và 123,78 hom/cây; việc cắt tia cạnh sau đồn tuy đã làm giảm số cành mang hom/cây, nhưng đã tạo ra các cành mang hom có số hom/cành cao hơn và cho năng suất hom/cây cao hơn so với không cắt tia. Trong đó, công thức 3 (cắt tia cạnh và bấm ngọn) cho năng suất hom cao nhất, đạt 142,44 hom/cây.

Từ khóa: phân bón, Sờ cam, thời vụ đồn, tia cạnh.

Chỉ số phân loại: 4.4

1. Đặt vấn đề

Sờ là tên gọi chung của các loài có hàm lượng dầu trong hạt tương đối cao thuộc chi *Camellia*, họ *Theaceae* [1]. Theo N.H. Nghĩa (1997) [2], cây Sờ sinh trưởng phát triển tốt trên các vùng đất đồi, đất cát pha, đất feralit đỏ vàng, đất rừng mới khai phá có tầng đất dày trên 50 cm, thoát nước, độ dốc không quá 25%, pH 4-5. Dầu Sờ được sử dụng rộng rãi như một loại dầu ăn ở các nước châu Á và trong hàm lượng dầu Sờ có chứa axit oleic, axit stearic, axit palmitic, axit linoleic, vitamin E và flavonoid [3]. Dầu Sờ có tác dụng bảo vệ chống lại tổn thương oxy hóa cấp tính do ethanol gây ra bằng cách ngăn chặn các protein apoptotic và quá trình peroxy hóa lipid, đồng thời tăng cường hoạt động của enzyme chống oxy hóa [4]. Hàm lượng và chất lượng dầu trong hạt Sờ phụ thuộc chủ yếu vào giống.

Để duy trì các đặc tính tốt của giống như năng suất, hàm lượng dầu trong hạt cao, rút ngắn thời gian từ khi trồng đến khi ra quả thì việc nhân giống bằng phương pháp vô tính (ghép, giâm hom) là cần thiết. Trên thế giới, việc nhân giống Sờ bằng phương pháp ghép đang được áp dụng rộng rãi. Ở Việt Nam, việc nhân giống Sờ bằng phương pháp ghép đã được nghiên cứu và bước đầu được áp dụng vào sản xuất ở Nghệ An, Quảng Ninh và một số địa phương khác. Tuy nhiên, việc nhân giống Sờ bằng phương pháp ghép có tỷ lệ ghép sống thấp, có thời gian sản xuất giống kéo dài (18-24

tháng), khó kiểm soát được bệnh hại, nên giá thành cây Sờ giống ghép cao (15.000-20.000 đồng/cây, chi phí giống cho 1 ha trồng mới lớn (15-20 triệu đồng/ha), khó có thể triển khai ra diện rộng.

Để khắc phục khó khăn trên, Viện Nghiên cứu và Phát triển Vùng, Bộ Khoa học và Công nghệ đã nghiên cứu nhân giống Sờ bằng phương pháp giâm hom. Giá thành cây Sờ giống khi giâm hom có thể thấp hơn cây ghép 50-60%. Tuy nhiên, để nhân giống Sờ bằng phương pháp giâm hom đạt tỷ lệ sống, tỷ lệ xuất vườn cao, cần có quy trình kỹ thuật sản xuất hom giống thích hợp. Để hoàn thiện quy trình sản xuất hom giống Sờ, chúng tôi nghiên cứu “Ảnh hưởng của thời vụ đồn nuôi hom, bón phân và tia cạnh đến năng suất hom giống Sờ cam (*Camellia oleifera* Abel)”.

Kết quả nghiên cứu này là một phần kết quả của đề tài cấp Bộ “Nghiên cứu xây dựng quy trình kỹ thuật nhân giống vô tính (giâm hom, ghép) Sờ (*Camellia* spp.) cho một số tỉnh miền núi phía Bắc”.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

Đối tượng thí nghiệm là các cây Sờ cam (*Camellia oleifera* Abel) 3 tuổi được trồng tại thị trấn Sông Cầu, huyện Đồng Hỷ, tỉnh Thái Nguyên. Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 1/2022 đến tháng 12/2023.

*Tác giả liên hệ: Email: ltkhang@most.gov.vn

Effect of cutting propagation time, fertilizer applied and pruning technique on productivity of tea-oil-plant (*Camellia oleifera* Abel)

Tat Khang Le*, Van Ngan Pham, Van Lam Nguyen, Phuong Tung Nguyen, Thi Ngoc Dinh, Thanh Phuong Le, Quang Thien Nong

Institute of Regional Research and Development, Ministry of Science and Technology, 70 Tran Hung Dao Street, Tran Hung Dao Ward, Hoan Kiem District, Hanoi, Vietnam

Received 17 April 2024; revised 25 April 2024; accepted 12 May 2024

Abstract:

This research aims to study the effects of cutting propagation, fertilizer applied NPK(16-16-8) and pruning technique on the productivity of *Camellia oleifera* Abel, in order to improve the production process of *Camellia oleifera* Abel cutting propagation. The research was conducted from 2022 to 2023, in a 3-year-old *Camellia oleifera* Abel nursery area in Song Cau town, Dong Hy district, Thai Nguyen province. The experiments were arranged in a randomised complete block with 3 repetitions. The results showed that the best cutting propagation time of *Camellia oleifera* Abel is from July 30th to August 15th, giving cutting propagation yields of 112.22 and 123.44 cuttings/plant, respectively. The method of applying 1.6 and 1.8 kg of NPK fertilizer (16-16-8)/plant gives the highest cutting propagation yield, reaching 120.56 cutting propagation/plant and 123.78 cutting propagation/plant, respectively. Although branch pruning has reduced the number of cutting branches/plants, it has created a higher number of cuttings/branches and higher cutting yield than without pruning. Among them, formula 3 (pruning branches and cutting tips) gives the highest cutting propagation, reaching 142.44 cuttings/plant.

Keywords: *Camellia oleifera* Abel, cutting propagation technique, fertiliser applied, pruning technique.

Classification number: 4.4

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Nghiên cứu xác định thời điểm đốn nuôi hom cho vườn giống gốc

Thí nghiệm gồm 4 công thức: công thức 1: đốn ngày 15/7; công thức 2: đốn ngày 30/7; công thức 3: đốn ngày 15/8 và công thức 4 đốn ngày 30/8. Mỗi công thức gồm 3 cây, 3 lần nhắc lại. Đốn tạo tán bằng ở độ cao 70 cm, khi đợt mầm đầu tiên xuất hiện tia bỏ những mầm dị dạng, mầm sâu bệnh. Bón 1,2 kg NPK (16-16-8), chia đều 2 lần (lần 1 sau đốn tạo tán, lần 2 bón nuôi hom sau khi tia bỏ cành dị dạng, sâu bệnh); bón sâu 5-7 cm, bón theo tán cây, khi đất ẩm (sau đốn 2-3 tháng). Các biện pháp kỹ thuật khác được tiến hành đồng đều theo quy trình kỹ thuật hiện hành.

2.2.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của lượng phân bón NPK (16-16-8) đến khả năng sản xuất hom của giống Sở cam

Thí nghiệm gồm 4 công thức: công thức 1: bón 1,2 kg NPK (16-16-8); công thức 2: bón 1,4 kg NPK (16-16-8); công thức 3: bón 1,6 kg NPK (16-16-8) và công thức 4: bón 1,8 kg NPK (16-16-8)/cây. Mỗi công thức gồm 3 cây, 3 lần nhắc lại. Đốn tạo tán bằng ở độ cao 70 cm, khi đợt mầm đầu tiên xuất hiện, tia bỏ những mầm dị dạng, mầm sâu bệnh; bón thúc lần 1 sau đốn tạo tán 50%, lần 2 bón nuôi hom 50%, còn lại sau khi tia bỏ cành dị dạng, sâu bệnh, bón sâu 5-7 cm, bón theo tán cây, khi đất ẩm (sau đốn 2-3 tháng). Các biện pháp kỹ thuật khác được tiến hành đồng đều theo quy trình kỹ thuật hiện hành.

2.2.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của kỹ thuật tỉa cành, bấm ngọn cành mang hom đến khả năng sản xuất hom của Sở cam

Thí nghiệm gồm 4 công thức: công thức 1: không tỉa cành sau đốn (để các cành mọc tự nhiên sau đốn); công thức 2: sau khi đốn 15-30 ngày, tỉa cành dị dạng, cành sâu bệnh, không bấm ngọn trước khi thu hom; công thức 3: sau khi đốn 15-30 ngày, tỉa cành dị dạng, cành sâu bệnh, bấm ngọn trước khi cắt 10 ngày; công thức 4: sau khi đốn 15-30 ngày, tỉa cành dị dạng, cành sâu bệnh, bấm ngọn trước khi cắt 15 ngày. Mỗi công thức gồm 3 cây, 3 lần nhắc lại. Bón 1,2 kg NPK (16-16-8), chia đều 2 lần (lần 1 sau đốn tạo tán, lần 2 bón nuôi hom sau khi tỉa bỏ cành dị dạng, sâu bệnh); bón sâu 5-7 cm, bón theo tán cây, khi đất ẩm (sau đốn 2-3 tháng). Các biện pháp kỹ thuật khác được tiến hành đồng đều theo quy trình kỹ thuật hiện hành.

Các chỉ tiêu theo dõi: (1) Thời gian từ đốn đến bật mầm (tính từ khi đốn đến khi có 5% số cành bật mầm); (2) chiều dài cành (cm) và số lá/cành; (3) số cành mang hom thu được/cây; (4) số hom cắt được/cành 150 ngày tuổi, (5) số hom thu được/cây. Các chỉ tiêu từ (2) đến (5) theo dõi vào thời điểm sau đốn 150 ngày.

Hom Sờ là đoạn cành có đường kính 2,0-2,5 mm, dài 2,0-2,5 cm, có 1 lá bánh tẻ, không sâu bệnh, được cắt từ cành mang hom; cành mang hom là cành bánh tẻ, không sâu bệnh, có 150 ngày tuổi tính từ ngày đốn nuôi hom. Cây Sờ thí nghiệm là Sờ cam, 3 tuổi, trồng tại vườn giống gốc, được nhân giống bằng phương pháp giâm hom của các cây tuyển chọn (cây ưu tú).

2.3. Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng Exel và IRRISTAT.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Ảnh hưởng của thời vụ đốn nuôi hom đến sinh trưởng và năng suất hom của giống Sờ cam

Bảng 1. Ảnh hưởng của thời vụ đốn nuôi hom đến sinh trưởng và năng suất hom của giống Sờ cam.

Công thức	Thời gian đốn	Thời gian bật mầm sau đốn (ngày)	Số cành mang hom/cây (cành)	Số hom/cành (hom)	Năng suất hom (hom)*
CT1 (đối chứng)	15/7/2022	24,00	14,00	8,00	100,78
CT2	30/7/2022	23,00	14,11	8,67	112,22
CT3	15/8/2022	23,67	15,22	8,78	123,44
CT4	30/8/2022	25,33	13,89	8,11	103,00
CV (%)		6,1	3,1	5,2	4,6
LSD _{0,5}		2,92	0,89	0,86	10,13

CT: công thức; *: năng suất hom thực thu (hom/cây).

Kết quả bảng 1 cho thấy:

- Thời gian từ đốn đến khi bật mầm của giống Sờ cam kéo dài từ 23,00 đến 25,33 ngày, trung bình là 24 ngày. Tuy nhiên, giữa các công thức không có sự khác nhau chắc chắn về thời gian bật mầm sau đốn.

- Về số cành mang hom/cây: số cành mang hom/cây ở các công thức biến động từ 13,89 đến 15,22 cành/cây, trong đó cao nhất là công thức 3 (đốn ngày 15/8, đạt 15,22 cành/cây, cao hơn đối chứng 1,22 cành/cây).

- Về số hom/cành (150 ngày tuổi): số hom/cành của các công thức thí nghiệm đạt từ 8,00 đến 8,78 cành, giữa các công thức không có sự sai khác chắc chắn về số cành/cây.

- Về năng suất hom/cây: năng suất hom/cây của giống Sờ cam ở các thí nghiệm đốn khác nhau đạt từ 103,00 đến 123,44 hom/cây, trong đó công thức 2 (đốn 30/7 và công thức 3 (đốn 15/8) cho số hom/cây cao nhất, đạt tương ứng trung bình là 112,22 và 123,44 hom/cây.

Như vậy, thời vụ đốn để sản xuất hom giống phục vụ cho nhân giống bằng phương pháp giâm hom của giống Sờ cam tốt nhất từ ngày 30/7 đến 15/8.

3.2. Ảnh hưởng của lượng phân bón NPK đến sinh trưởng và năng suất hom của giống Sờ cam

Bảng 2. Ảnh hưởng của lượng phân bón NPK (16-16-8) đến sinh trưởng và năng suất hom của giống Sờ cam.

Công thức	Lượng phân NPK (kg/cây)	Thời gian bật mầm sau đốn (ngày)	Số cành mang hom/cây (cành)	Số hom/cành (hom)	Số hom/cây (hom)*
CT1 (đối chứng)	1,2	24,67	13,78	8,00	95,67
CT2	1,4	24,00	14,22	8,66	111,44
CT3	1,6	23,33	15,22	8,89	120,56
CT4	1,8	23,00	15,33	9,00	123,78
CV (%)		3,4	0,8	3,9	5,4
LSD _{0,5}		1,6	0,24	0,66	12,28

CT: công thức; *: năng suất hom thực thu (hom/cây).

Kết quả bảng 2 cho thấy:

- Thời gian bật mầm sau đốn của các công thức biến động từ 23,00 đến 24,67 ngày, trong đó các công thức 3 và công thức 4 bón lượng phân 1,6 và 1,8 kg/cây đã rút ngắn thời gian bật mầm từ 1,34 đến 1,67 ngày so với công thức đối chứng bón 1,2 kg/cây.

- Về số cành mang hom/cây: số cành mang hom/cây ở các công thức bón phân biến động từ 13,78 đến 15,33 cành/cây, trong đó các công thức được bón phân từ 1,4 đến 1,8 kg/cây đã có từ 14,22 đến 15,33 cành/cây, cao hơn công thức đối chứng bón 1,2 kg/cây, tương ứng từ 0,44 cành đến 1,55 cành/cây.

- Về số hom/cành (150 ngày tuổi): khi tăng lượng phân bón NPK đã ảnh hưởng rõ rệt đến số hom/cành. Các công thức 2, công thức 3 và công thức 4 có số hom/cành đạt từ 8,66 đến 9,00, cao hơn đối chứng từ 0,66 đến 1,00 hom/cành.

- Về năng suất hom, số hom thu được/cây ở các công thức thí nghiệm biến động từ 95,67 đến 123,78 hom/cây, trong đó các công thức bón lượng phân tăng so với đối chứng đều cho số hom/cành cao hơn đối chứng từ 15,77 đến 28,11 hom/cây. Tuy nhiên, khi tăng từ 1,6 kg/cây lên 1,8 kg/cây thì năng suất hom giữa các công thức này không có sự khác nhau chắc chắn.

3.3. Ảnh hưởng của kỹ thuật tỉa cành, bấm ngọn đến sinh trưởng và năng suất hom của giống Sở cam

Bảng 3. Ảnh hưởng của kỹ thuật tỉa cành, bấm ngọn đến sinh trưởng và năng suất hom của giống Sở cam.

Công thức	Kỹ thuật tỉa cành	Số cành/cây (cành)	Số hom/cành (hom)	Đường kính hom (mm)	*Số hom/cây (hom)
CT1 (đối chứng)	Không tỉa cành sau đốn	22,67	5,89	1,71	120,00
CT2	Tỉa cành dị dạng, cành sâu bệnh, không bấm ngọn trước khi thu hom	15,11	8,78	2,05	131,44
CT3	Tỉa cành dị dạng, cành sâu bệnh, bấm ngọn trước khi cắt 10 ngày	15,22	9,56	2,12	142,44
CT4	Tỉa cành dị dạng, cành sâu bệnh, bấm ngọn trước khi cắt 15 ngày	14,78	9,11	2,21	139,11
CV (%)		2,9	3,5	4,8	3,3
LSD _{0,5}		0,97	0,59	0,19	8,15

CT: công thức; *: năng suất hom thực thu (hom/cây).

Kết quả bảng 3 cho thấy:

- Ở các công thức có cắt tỉa cành (công thức 2, công thức 3 và công thức 4) có số cành mang hom từ 14,78 đến 15,22 cành/cây, thấp hơn so với đối chứng (không tỉa cành sau đốn) từ 7,45 đến 7,89 cành/cây. Tuy nhiên, giữa các công thức 2, công thức 3 và công thức 4 không có sự sai khác về số cành mang hom/cây.

- Về số hom/cành (150 ngày tuổi): số hom/cành của các công thức có cắt tỉa (công thức 2, 3 và 4) đạt từ 8,78 đến 9,56 hom/cành, cao hơn đối chứng từ 2,89 đến 3,67 hom/cành, trong đó đạt cao nhất là công thức 3 (tỉa cành và bấm ngọn trước thu hoạch 10 ngày).

- Về đường kính hom: kết quả bảng 3 cho thấy, việc tỉa cành làm mật độ cành giảm, nhưng đã tạo điều kiện để các cành còn lại sinh trưởng tốt hơn, có đường kính hom cao hơn, đồng đều hơn. Các công thức 2, công thức 3 và công thức 4 (có cắt tỉa) có đường kính hom đạt từ 2,05 đến 2,21 mm, cao hơn đối chứng từ 0,34 đến 0,50 mm, giữa các công thức này không có sự sai khác chắc chắn về đường kính hom.

- Về số hom/cây (năng suất hom): việc cắt tỉa cành có ảnh hưởng rõ rệt tới năng suất hom/cây. Năng suất hom/cây của các công thức cắt tỉa (công thức 2, công thức 3 và công thức 4) đạt từ 131,44 đến 142,44 hom/cây, cao hơn công thức đối chứng (không cắt tỉa) từ 11,44 đến 22,44 hom/cây. Giữa các công thức này không có sự sai khác chắc chắn về năng suất hom.

4. Kết luận và kiến nghị

4.1. Kết luận

1. Thời vụ đốn để sản xuất hom giống không có ảnh hưởng rõ rệt tới thời gian nảy mầm sau đốn và số hom/cành,

nhưng có ảnh hưởng rõ đến số cành mang hom và năng suất hom/cây. Thời vụ đốn sản xuất hom của giống Sở cam tốt nhất từ ngày 30/7 đến ngày 15/8, cho năng suất hom tương ứng là 112,22 và 123,44 hom/cây.

2. Bón lượng phân NPK (16-16-8)/cây cho Sở cam có ảnh hưởng khác nhau đến thời gian bật mầm sau đốn, số cành/cây, số hom/cành và năng suất hom, các công thức bón 1,6 và 1,8 kg/cây cho năng suất hom cao nhất, đạt lần lượt là 120,56 và 123,78 hom/cây. Tuy nhiên, giữa công thức 3 (bón 1,6 kg) và công thức 4 (1,8 kg) không có sự khác nhau chắc chắn về năng suất hom.

3. Việc cắt tỉa tuy đã làm giảm số cành mang hom/cây, nhưng đã tạo điều kiện cho các cành mang hom sinh trưởng mạnh hơn, có số hom/cành cao hơn, đường kính to hơn và cho năng suất hom cao hơn so với không cắt tỉa. Trong đó, công thức 3 (cắt tỉa cành và bấm ngọn) cho năng suất hom cao nhất, đạt 142,44 hom/cây.

4.2. Kiến nghị

Để nhân giống Sở cam bằng phương pháp giâm hom đạt tỷ lệ sống và tỷ lệ xuất vườn cao cần thiết phải có vườn giống gốc để sản xuất hom giống. Ngoài các biện pháp kỹ thuật canh tác thông thường thì vườn sản xuất hom giống cần được đốn nuôi hom vào khoảng thời gian từ ngày 15/7 đến ngày 15/8; bón 1,6 kg NPK (16-16-8)/cây, chia đều, bón làm 2 lần: lần 1 vào thời gian sau đốn và lần 2 sau khi tỉa định cành; để có nhiều hom đạt tiêu chuẩn (đường kính 2,0-2,5 mm, dài 2,0-2,5 cm, có một lá bánh tẻ, không sâu bệnh), sau khi đốn tạo tán nuôi hom, cần tỉa bỏ cành dị dạng, cành sâu bệnh và bấm ngọn trước khi cắt hom 10-15 ngày.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được tài trợ kinh phí bởi Bộ Khoa học và Công nghệ. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] M.C. Lam, T.V. Trung (2005), *Overview Research on The Development of Camellia Oleifera C. Abel in China*, Conference Document on The Development of *Camellia oleifera* C. Abel in Hanoi (in Vietnamese).
- [2] N.H. Nghia (1997), *Research on Varieties Choice and Development of Camellia Oleifera C. Abel in Vietnam*, Final Project Report, Vietnamese Academy of Forest Sciences (in Vietnamese).
- [3] C. Yang, X. Liu, Z. Chen, et al. (2016), "Comparison of oil content and fatty acid profile of ten new *Camellia oleifera* cultivars", *Journal of Lipids*, DOI: 10.1155/2016/3982486.
- [4] P.S. Tu, Y.T. Tung, W.T. Lee, et al. (2017), "Protective effect of camellia oil (*Camellia oleifera* Abel.) against ethanol-induced acute oxidative injury of the gastric mucosa in mice", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **65**(24), pp.4932-4941, DOI: 10.1021/acs.jafc.7b01135.

Nhân giống *in vitro* cây lan Hoàng thảo U lồi (*Dendrobium wardianum*)

Nguyễn Thị Lại^{1*}, Nguyễn Thị Bình¹, Nguyễn Thị Ngọc Bích¹, Phạm Minh Khoa²

¹Trung tâm Ươm tạo Công nghệ và Doanh nghiệp Khoa học Công nghệ,
Viện Ứng dụng Công nghệ, C6, phường Thanh Xuân Bắc, quận Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

²Trường THPT Chuyên Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên,
Đại học Quốc gia Hà Nội, 182 Lương Thế Vinh, phường Thanh Xuân Bắc, quận Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 6/10/2022; ngày chuyển phản biện 8/10/2022; ngày nhận phản biện 31/10/2022; ngày chấp nhận đăng 4/11/2022

Tóm tắt:

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành nhân giống cây lan Hoàng thảo U lồi (*Dendrobium wardianum*) bằng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro*. Kết quả cho thấy, nhân nhanh thể sinh chồi (protocorm) tốt nhất trên môi trường MS bổ sung 2,0 mg/l BAP, 1 mg/l IBA và 40 g/l chuối nghiền sau 8 tuần nuôi cấy với hệ số nhân protocorm đạt 18,8 lần; môi trường MS bổ sung 1,5 mg/l KIN, 30 g/l cà rốt nghiền là tốt nhất đến sự tái sinh chồi *in vitro* sau 8 tuần nuôi cấy, với 32,58 chồi/mẫu, chiều cao chồi 2,5 cm và 3,5 lá/chồi. Chồi ra rễ *in vitro* tốt nhất trên môi trường MS được bổ sung 1 mg/l αNAA, 30 g/l cà rốt nghiền với số lượng rễ trung bình cao nhất 10,8 rễ/chồi và chiều dài rễ trung bình dài nhất 3,01 cm sau 6 tuần nuôi cấy. Hỗn hợp rêu rừng, đá bọt núi lửa, xơ dừa (tỷ lệ 30:30:40) được xác định là giá thể phù hợp nhất cho sự sinh trưởng của cây con trong điều kiện vườn ươm sau 6 tuần nuôi trồng, với tỷ lệ sống đạt 96,6%, chiều cao cây đạt 9,10 cm, 8,7 lá/cây và 3,8 rễ mới/cây.

Từ khóa: Hoàng thảo U lồi, lan rừng, nhân giống *in vitro*, nhân nhanh thể sinh chồi.

Chỉ số phân loại: 4.6

1. Đặt vấn đề

Lan Hoàng thảo U lồi (*Dendrobium wardianum*) thuộc chi Hoàng thảo (*Dendrobium*) là loài lan rừng đẹp, có mùi hương rất thơm, có giá trị y học và thương mại cao. Trên thế giới, lan Hoàng thảo U lồi có nhiều ở Ấn Độ, Butan, Trung Quốc, Myanmar, Thái Lan. Ở Việt Nam, chúng phân bố chủ yếu tại Lào Cai (Sa Pa), Ninh Bình (Cúc Phương)... Lan Hoàng thảo U lồi chủ yếu sống phụ sinh trên thân, cành cây ở trong rừng hoặc trên các hốc mùn trên đá, thường ở nơi ẩm, mọc ở độ cao 200-1200 m.

Lan Hoàng thảo U lồi có tác dụng chống ôxy hóa và chống tế bào ung thư ở người (các dòng tế bào khối u HL-60, A-549, SMMC-7721, MCF-7 và SW-480) với IC50 2,33-38,48 μM... [1].

Những năm gần đây, do nạn phá rừng và tình trạng khai thác một cách tận diệt, mặt khác khả năng nảy mầm trong môi trường sống tự nhiên rất thấp vì hạt lan không chứa nội nhũ, cần phải cộng sinh của một số loại nấm thuộc chi *Rhizoctonia* mới nảy mầm được, nên loài lan Hoàng thảo U lồi có nguy cơ tuyệt chủng và được đưa vào Sách Đỏ Việt Nam [2]. Nhân giống lan Hoàng thảo bằng phương pháp truyền thống (tách chồi, cắt đoạn thân...) mất nhiều thời gian và không hiệu quả [3]. Kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* là phương pháp được sử dụng nhiều trong nhân giống nhiều loại lan quý hiếm thuộc chi lan Hoàng thảo, tạo ra được một số lượng cây giống lớn có chất lượng cao, sạch bệnh trong thời gian ngắn và chi phí thấp. Đây là biện pháp góp phần bảo vệ, phát triển nguồn gen của loài thực vật quý hiếm này.

*Tác giả liên hệ: Email: orchidnlai@gmail.com

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Mẫu lan Hoàng thảo U lồi (*Dendrobium wardianum*) được thu thập ở Vườn quốc gia Cúc Phương, Ninh Bình. Quả lan sau khi thụ phấn được 10 tháng sử dụng để làm vật liệu nuôi cấy khởi đầu.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Khử trùng mẫu và nảy mầm hạt: Quả lan sau khi thu hái được rửa sạch bằng xà phòng dưới vòi nước chảy và ngâm trong dung dịch presept 0,5% trong 10 phút, sau đó rửa lại nhiều lần bằng nước cất vô trùng, cuối cùng ngâm trong dung dịch javel 30% trong 10 phút và rửa lại 3 lần với nước cất vô trùng. Hạt được tách ra và gieo trên môi trường cơ bản VW (Vacin & Went), MS (Murashige & Shoog) và RE (Robert Ernst) có bổ sung 20 g/l sucrose, 6 g/l agar, 100 ml/l nước dừa + 2 mg/l Benzylaminopurine (BAP). Tỷ lệ hạt nảy mầm (%), thời gian xuất hiện protocorm (ngày) được đánh giá sau 6 tuần nuôi cấy.

Nhân nhanh protocorm: Protocorm được tách thành từng khối có đường kính khoảng 0,5x0,5 cm được cấy chuyển qua môi trường MS + 20 g/l sucrose + 6 g/l agar + 100 ml/l nước dừa + 1 g/l than hoạt tính bổ sung 2 mg/l BAP + 0-2 mg/l Indole-3-butyric acid (IBA); 2 mg/l BAP + 1 mg/l IBA + 0-50 g/l dịch chuối nghiền để khảo sát khả năng nhân nhanh protocorm. Hệ số nhân protocorm (lần) và đặc điểm hình thái của protocorm được đánh giá sau 8 tuần nuôi cấy.

In vitro propagation of the *Dendrobium wardianum*

Thi Lai Nguyen^{1*}, Thi Binh Nguyen¹,
Thi Ngoc Bich Nguyen¹, Minh Khoa Pham²

¹Nacentech Technology and Business Incubator Center, National Center for Technological Progress,
C6, Thanh Xuan Bac Ward, Thanh Xuan District, Hanoi, Vietnam

²HUS High School for Gifted Students, University of Science, Vietnam National University - Hanoi,
182 Luong The Vinh Street, Thanh Xuan Bac Ward, Thanh Xuan District, Hanoi, Vietnam

Received 6 October 2022; revised 31 October 2022; accepted 4 November 2022

Abstract:

In the present study, we investigated the propagation of *Dendrobium wardianum* by *in vitro* culture technique. The results showed that: the most suitable protocorm multiplication medium is MS medium supplemented with 2 mg/l BAP, 1 mg/l IBA, 40 g/l mashed banana after 8 weeks of culture, with a protocorm multiplier of 18.8; MS medium supplemented with 1.5 mg/l KIN, 30 g/l mashed carrot gave the best on *in vitro* shoot regeneration after 8 weeks of culture, with 32.58 shoots/explant, shoot height of 2.5 cm and 3.5 leaves/shoot. Shoots were rooted well on MS medium supplemented with 1 mg/l α NAA, 30 g/l mashed carrot with the highest mean number of roots (10.8 roots per shoot) and the longest mean root length (3.01 cm) after 6 weeks of culture. In the nursery, a mixture of forest moss, volcanic pumice, and coconut fibre (30:30:40) ratio was regarded as the best substrate due to the high survival rate of plantlets (96.6%) and healthy plantlets (9.10 cm in height with 8.7 leaves and 3.8 new roots/plantlet) at 6 weeks after planting.

Keywords: *Dendrobium wardianum*, *in vitro* propagation, protocorm, wild orchids.

Classification number: 4.6

Tái sinh chồi từ protocorm: Protocorm được cấy vào môi trường MS + 20 g/l sucrose + 6 g/l agar + 100 ml/l nước dừa + 1 g/l than hoạt tính, bổ sung 0-2,0 mg/l Kinetin (KIN); 1,5 mg/l KIN + 0-50 g/l cà rốt nghiền để thăm dò khả năng tạo chồi. Số chồi/mẫu (chồi), chiều cao chồi (cm), số lá/chồi (lá) và chất lượng chồi được đánh giá sau 8 tuần nuôi cấy.

Tạo rễ từ chồi *in vitro*: Các chồi *in vitro* có chiều cao 2-3 cm, 2-3 lá, chồi khô chưa có rễ được tách ra và cấy sang môi trường ra rễ có bổ sung 0-2,0 mg/l α -naphthalene acetic acid (α NAA), 20 g/l sucrose, 6,0 g/l agar, 100 ml/l nước dừa, 1 g/l than hoạt tính, 30 g/l dịch cà rốt nghiền để khảo sát khả năng hình thành rễ. Chiều cao cây (cm), số lá (lá), số rễ (rễ), chiều dài rễ (cm) và chất lượng rễ được đánh giá sau 6 tuần nuôi cấy.

Đưa cây *in vitro* ra vườn ươm: Các cây con *in vitro* có chiều cao 5-6 cm, 3-5 rễ và 3-4 lá. Cây con được rửa hết agar, rải đều trên khay sạch để trong 1 giờ, sau đó trồng vào chậu đất nung kích thước 12x10 cm trên các giá thể: rêu rừng, đá bọt núi lửa, xơ dừa (tỷ lệ 30:30:40), sau khi cây trồng được 2 tuần phun phân bón lá Growmore (30:10:10) liều lượng 1 g/l/lần/tuần, để khảo sát khả năng sinh trưởng của cây *in vitro* ở giai đoạn vườn ươm. Các chỉ tiêu theo dõi tỷ lệ sống (%), chiều cao cây (cm), số lá (lá), số rễ mới xuất hiện (rễ) và chất lượng cây được đánh giá sau 6 tuần nuôi cấy.

Phương pháp xử lý số liệu: Sử dụng phần mềm Excel 2010 để hệ thống hoá các thông tin, số liệu phục vụ phân tích, đánh giá. Các số liệu được xử lý và phân tích thống kê bằng phần mềm IRRISTAT5.0.

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Thời gian thực hiện: Tháng 1/2022-10/2022.

Địa điểm: Trung tâm Ươm tạo Công nghệ và Doanh nghiệp Khoa học Công nghệ, Viện Ứng dụng Công nghệ.

Điều kiện nuôi cấy *in vitro*: Nhiệt độ phòng 25 $\pm$ 2°C, ẩm độ 65-70%, thời gian chiếu sáng 10 giờ/ngày, cường độ ánh sáng 2.000-2.500 lux.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Tạo vật liệu khởi đầu

Ảnh hưởng của môi trường khoáng VW, MS, RE khác nhau đến khả năng nảy mầm của hạt được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của môi trường khoáng khác nhau đến giai đoạn tạo vật liệu khởi đầu.

Môi trường khoáng	Tỷ lệ hạt nảy mầm (%)	Thời gian xuất hiện Protocorm (tuần)
VW	95 ^b	5 ^b
MS	100 ^a	4 ^c
RE	86 ^c	6 ^a
LSD _{0,05}	2,2	1,5
CV (%)	2,61	1,8

Trong cùng một cột, các công thức có chỉ số mũ khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa ở mức độ tin cậy 95%.

Kết quả bảng 1 cho thấy, sau 6 tuần nuôi cấy tỷ lệ hạt nảy mầm và thời gian xuất hiện protocorm của lan Hoàng thảo U lồi trên môi trường khoáng khác nhau là không giống nhau. Trên nền môi trường MS, tỷ lệ nảy mầm của hạt lan là cao nhất (đạt 100%) và thời gian xuất hiện protocorm ngắn nhất (chỉ 4 tuần); tỷ lệ hạt nảy mầm nền môi trường VW (đạt 95%), thời gian xuất hiện protocorm ở mức trung bình (5 tuần). Nền môi trường RE cho tỷ lệ nảy mầm của hạt khá

thấp (86%) và thời gian xuất hiện protocorm dài hơn so với 2 nền môi trường trên (6 tuần). Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng phù hợp với nghiên cứu của S.M. Abbaszadeh và cs (2018) [3] là sử dụng môi trường MS thích hợp thì tỷ lệ nảy mầm của hạt đạt 94% với lan *Phalaenopsis* 'Bahia Blanca' và 95,27% với lan *D. hookerianum* [4].

3.2. Nhân nhanh protocorm

Ảnh hưởng của BAP + IBA đến khả năng nhân nhanh protocorm được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của tổ hợp BAP + IBA đến khả năng nhân nhanh protocorm.

Nồng độ BAP (mg/l)	Nồng độ IBA (mg/l)	Hệ số nhân protocorm (lần)	Đặc điểm hình thái của protocorm
2,0	0,0	3,5 ^d	Nhỏ, màu xanh nhạt
2,0	0,5	8,2 ^b	Khỏe, màu xanh
2,0	1,0	10,3 ^a	Khỏe, màu xanh
2,0	1,5	5,8 ^c	Gầy, màu xanh nhạt
2,0	2,0	2,8 ^c	Gầy, có hiện tượng màu vàng và chết
LSD _{0,05}		0,56	
CV (%)		3,4	

Trong cùng một cột, các công thức có chỉ số mũ khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa ở mức độ tin cậy 95%.

Kết quả ở bảng 2 cho thấy, sự kết hợp giữa BAP + IBA có ảnh hưởng hiệu quả đến khả năng hình thành protocorm. Ở nồng độ 1 mg/l IBA kết hợp với 2 mg/l BAP cho hệ số nhân protocorm cao nhất đạt 10,3 protocorm (lần), protocorm xanh và khỏe. Khi tăng nồng độ IBA lên 1,5-2 mg/l hệ số nhân protocorm giảm dần, thậm chí còn thấp hơn so với đối chứng, protocorm gầy, có hiện tượng màu vàng và chết. Nguyên nhân do IBA ở nồng độ cao làm ức chế khả năng phát sinh protocorm, kìm hãm sự phát triển của khối protocorm. Do vậy, có thể kết luận rằng nồng độ 1 mg/l IBA kết hợp với 2 mg/l BAP thích hợp cho quá trình tạo protocorm của cây lan Hoàng thảo U lồi.

3.3. Ảnh hưởng của dịch nghiền chuối đến khả năng nhân nhanh protocorm

Trong quá trình nuôi cấy *in vitro*, việc bổ sung các hợp chất hữu cơ tự nhiên vào môi trường sẽ có tác dụng thúc đẩy sinh trưởng và phát triển của mẫu cấy. Theo Y. Hasanah và cs (2020) [5], trong quả chuối có chứa một số chất điều hòa sinh trưởng thực vật tự nhiên như: IAA, gibberellin, cytokinin, sắt; kali, vitamin B6, B12, tryptophan thúc đẩy protocorm tăng trưởng [6]. Để tìm hiểu ảnh hưởng của dịch nghiền chuối đến quá trình nhân nhanh protocorm, chúng tôi tiến hành bổ sung dịch nghiền chuối với các hàm lượng khác nhau vào môi trường nuôi cấy (bảng 3).

Bảng 3. Ảnh hưởng của dịch nghiền chuối đến khả năng nhân nhanh protocorm.

Dịch nghiền chuối (g/l)	Hệ số nhân protocorm (lần)	Đặc điểm hình thái của protocorm
0 (đối chứng)	10,2 ^f	Khỏe, màu xanh
10	12,7 ^e	Khỏe, màu xanh
20	13,5 ^d	Khỏe, màu xanh
30	15,8 ^c	Khỏe, màu xanh đậm
40	18,8 ^a	To, khỏe, màu xanh đậm
50	17,5 ^b	To, khỏe, màu xanh đậm
LSD _{0,05}		0,50
CV (%)		2,0

Trong cùng một cột, các công thức có chỉ số mũ khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa ở mức độ tin cậy 95%.

Kết quả từ bảng 3 cho thấy, dịch nghiền chuối có tác dụng hiệu quả với quá trình nhân nhanh protocorm. Bổ sung dịch nghiền chuối hàm lượng 40 g/l cho hệ số nhân protocorm đạt cao nhất 18,8 protocorm (lần), trong khi đối chứng môi trường không bổ sung dịch nghiền chuối chỉ đạt 10,2 protocorm (lần). Theo nghiên cứu của M.O. Islam và cs (2016) [7], khi bổ sung 100 ml dịch chiết chuối vào môi trường nuôi cấy có tác dụng kích thích sự hình thành và phát triển chồi từ protocorm với lan *Dendrobium* sp.. Bổ sung dịch chiết chuối 10 g/l vào môi trường VW cho hệ số nhân protocorm đạt cao nhất đối với lan *Phalaenopsis amboinensis* [8], khả năng hình thành protocorm tốt nhất trên môi trường MS bổ sung 50 g/l dịch chuối với lan *Cymbidium pendulum* [9]. Kết quả của chúng tôi đã phản ánh sự sai khác so với các nghiên cứu trước, có thể do giống và trên nền môi trường nuôi cấy khác nhau. Như vậy, hàm lượng dịch nghiền chuối 40 g/l thích hợp cho việc nhân protocorm lan Hoàng thảo U lồi.

3.4. Tái sinh chồi từ protocorm

Ảnh hưởng của KIN đến khả năng tái sinh chồi từ protocorm được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Ảnh hưởng của KIN đến khả năng tái sinh chồi từ protocorm.

Nồng độ KIN (mg/l)	Số chồi/mẫu (chồi)	Chiều cao chồi (cm)	Số lá/chồi (lá)	Chất lượng chồi
0,0 (đối chứng)	2,5 ^d	0,70 ^b	1,5 ^d	Chồi nhỏ, lá xanh nhạt
0,5	7,9 ^b	0,93 ^{ab}	1,8 ^c	Chồi nhỏ, lá xanh
1,0	8,7 ^b	1,10 ^{ab}	2,3 ^b	Chồi bình thường, lá xanh
1,5	12,5 ^a	1,36 ^a	2,6 ^a	Chồi to, lá xanh
2,0	6,6 ^c	0,75 ^b	2,1 ^b	Chồi có biểu hiện biến dị, nhỏ và vàng
LSD _{0,05}		0,80	0,5	
CV (%)		1,8	2,3	

Trong cùng một cột, các công thức có chỉ số mũ khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa ở mức độ tin cậy 95%.

Kết quả ở bảng 4 cho thấy, bổ sung KIN nồng độ 0-1,5 mg/l thì sự hình thành chồi và sinh trưởng của chồi cũng tăng lên. Ở nồng độ 1,5 mg/l KIN khả năng tái sinh chồi từ protocorm đạt cao nhất: số chồi/mẫu là 12,5 chồi, chiều cao chồi đạt 1,36 cm, số lá đạt 2,6 lá. Tuy nhiên, khi nồng độ KIN tăng lên 2 mg/l thì sự hình thành chồi và sinh trưởng chồi giảm xuống, chồi có biểu hiện biến dị, nhỏ và vàng, có thể giải thích KIN ở nồng độ cao ức chế protocorms phát triển thành chồi cây. Kết quả của chúng tôi cũng phù hợp với nghiên cứu của T.Q. Dan và cs (2018) [10] trên môi trường MS bổ sung 1,5 mg/l KIN thuận lợi nhất cho sự hình thành chồi và sinh trưởng của chồi lan *Renanthera imschootiana* Rolfe.

Ảnh hưởng của dịch nghiền cà rốt đến khả năng tái sinh chồi từ protocorm được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5. Ảnh hưởng của dịch nghiền cà rốt đến khả năng tái sinh chồi từ protocorm.

Hàm lượng dịch nghiền cà rốt (g/l)	Số chồi/mẫu (chồi)	Chiều cao chồi (cm)	Số lá/chồi (lá)	Chất lượng chồi
0,0 (đối chứng)	12,3 ^f	1,34 ^d	2,5 ^d	Chồi to, lá xanh
10	19,8 ^e	1,40 ^d	3,0 ^e	Chồi to, khỏe, lá xanh
20	24,0 ^d	1,46 ^d	3,2 ^b	Chồi to, khỏe, lá xanh
30	32,58 ^c	2,5 ^a	3,5 ^a	Chồi to khỏe, lá to màu xanh đậm
40	28,6 ^b	1,75 ^b	3,4 ^a	Chồi to, khỏe, lá to màu xanh đậm
50	26,2 ^c	1,70 ^b	2,9 ^c	Chồi to, lá màu xanh
<i>LSD</i> _{0,05}	0,64	0,28	0,19	
<i>CV</i> (%)	1,7	2,1	3,7	

Trong cùng một cột, các công thức có chỉ số mũ khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa ở mức độ tin cậy 95%.

Kết quả ở bảng 5 cho thấy, dịch nghiền cà rốt đã ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng phát sinh chồi từ protocorm. Các hàm lượng dịch nghiền cà rốt khác nhau, sự phát sinh chồi từ protocorm cũng khác nhau, ở hàm lượng 30 g/l dịch nghiền cà rốt bổ sung vào môi trường cho kết quả tốt nhất, với số chồi 32,58 chồi/mẫu, chiều cao đạt 2,5 cm, số lá/chồi là 3,5 lá. Điều này có thể do trong dịch nghiền cà rốt giàu carbohydrate, Ca, P, Fe, Mg [11] và cytokinin, vitamin, axit amin, sterol nội sinh [12] có tác dụng tăng khả năng tái sinh chồi từ protocorm và sự sinh trưởng của chồi. Tuy nhiên, khi tăng hàm lượng dịch nghiền cà rốt lên 40-50 g/l thì khả năng tái sinh chồi từ protocorm và sự sinh trưởng của chồi có xu hướng giảm dần. Khi hàm lượng dịch nghiền cà rốt trong môi trường nuôi cấy quá cao làm ức chế sự tái sinh của chồi, có thể do áp lực thẩm thấu của môi trường cao và ngăn chặn sự hấp thu nước và các chất cần thiết cho sự phát triển của chồi. Như vậy, hàm lượng dịch nghiền cà rốt 30 g/l thích hợp cho việc tái sinh chồi cũng như sinh trưởng phát triển của chồi, chồi to khỏe, lá to màu xanh đậm.

3.5. Nghiên cứu tạo cây *in vitro* hoàn chỉnh

Ảnh hưởng của α NAA đến khả năng tạo rễ cây con *in vitro* được trình bày ở bảng 6.

Bảng 6. Ảnh hưởng của α NAA đến khả năng tạo rễ cây con *in vitro*.

Nồng độ α NAA (mg/l)	Chiều cao cây (cm)	Số lá (lá)	Số rễ (rễ)	Chiều dài rễ (cm)	Chất lượng rễ
0 (đối chứng)	3,73 ^e	3,5 ^e	4,03 ^e	1,32 ^d	Rễ nhỏ, ngắn, màu trắng
0,5	6,02 ^c	5,8 ^c	7,10 ^c	2,15 ^c	Rễ nhỏ, ngắn, màu trắng
1,0	7,2 ^a	6,6 ^a	10,8 ^a	3,01 ^a	Rễ mập, dài, khỏe, màu trắng đục, chóp rễ xanh
1,5	6,30 ^b	6,10 ^b	7,60 ^b	2,50 ^b	Rễ nhỏ, dài, màu xanh nhạt
2,0	4,52 ^d	4,9 ^d	5,15 ^d	2,20 ^c	Rễ nhỏ, ngắn, đầu rễ đen
<i>LSD</i> _{0,05}	0,13	0,16	0,27	0,07	
<i>CV</i> %	1,2	1,6	2,1	1,6	

Trong cùng một cột, các công thức có chỉ số mũ khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa ở mức độ tin cậy 95%.

Kết quả ở bảng 6 cho thấy, tất cả các công thức thí nghiệm đều hình thành rễ, điều này cho thấy cây lan Hoàng thảo U lồi là một loài lan dễ tái sinh rễ *in vitro*. Tuy nhiên, ở những môi trường khác nhau thì khả năng tạo rễ có sự khác nhau, môi trường bổ sung 1 mg/l α NAA bổ sung vào môi trường nuôi cấy sau 6 tuần theo dõi cây đạt các chỉ tiêu sinh trưởng tốt nhất, chiều cao cây đạt 7,2 cm, số lá đạt 6,6 lá/cây, số rễ (10,8 rễ/cây), chiều dài rễ đạt 3,01 cm, rễ mập, dài, khỏe, màu trắng đục, chóp rễ xanh. Khi nồng độ α NAA tăng lên 1,5-2 mg/l thì giảm số lượng rễ tạo thành, rễ ngắn, nhỏ màu xanh nhạt, hiện tượng này có thể do nồng độ auxin tăng, làm ức chế quá trình ra rễ. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của L.T. Vinh và cs (2022) [13] trên môi trường bổ sung 1 mg/l α NAA thuận lợi nhất cho sự ra rễ *in vitro* lan *D. anosmum* và cây Vanilla [14].

3.6. Đưa cây *in vitro* ra vườn ươm

Ảnh hưởng của các loại giá thể đến tỷ lệ sống của cây con *in vitro* được trình bày ở bảng 7.

Bảng 7. Ảnh hưởng của các loại giá thể đến tỷ lệ sống của cây con *in vitro* (sau 6 tuần nuôi trồng).

Loại giá thể	Tỷ lệ sống (%)	Chiều cao cây (cm)	Số lá (lá)	Số rễ mới xuất hiện (rễ)	Chất lượng cây
G1	76,0 ^c	7,35 ^b	5,7 ^d	2,5 ^b	Cây yếu, lá nhỏ, màu xanh nhạt, rễ mới hình thành ít
G2	78,3 ^b	7,62 ^b	6,9 ^b	2,7 ^b	Cây yếu, lá xanh nhạt và nhỏ, rễ mới hình thành ít
G3	70,1 ^d	6,23 ^c	6,5 ^c	2,2 ^c	Cây nhỏ yếu, lá xanh nhạt, rễ mới hình thành ít
G4	96,6 ^a	9,10 ^a	8,7 ^a	3,8 ^a	Cây to khỏe, lá xanh đậm, ra rễ mới nhiều, rễ xanh, này chồi con
<i>LSD</i> _{0,05}	1,54	0,62	0,33	0,20	
<i>CV</i> %	4,7	4,2	2,4	3,5	

Trong cùng một cột, các công thức có chỉ số mũ khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa ở mức độ tin cậy 95%. G1: rêu rừng; G2: đá bọt núi lửa; G3: xơ dừa; G4: hỗn hợp rêu rừng, đá bọt núi lửa và xơ dừa (tỷ lệ 30:30:40).

Kết quả ở bảng 7 cho thấy, giá thể có ảnh hưởng rõ rệt đến tỷ lệ sống và sinh trưởng của cây con ở giai đoạn vườn ươm. Trên giá thể rêu rừng, đá bọt núi lửa, xơ dừa, các chỉ tiêu tỷ lệ sống chỉ đạt 70,1-78,3%, cây nhỏ yếu, lá xanh nhạt, rễ mới hình thành ít. Cây trồng trên giá thể gồm rêu rừng, đá bọt núi lửa và xơ dừa (tỷ lệ 30:30:40) cho tỷ lệ sống cao nhất (96,6%), khả năng sinh trưởng cũng tốt nhất (chiều cao cây đạt 9,10 cm với 3,8 rễ mới và 8,7 lá/cây), cây khỏe, thân cứng, rễ bám tốt vào giá thể và xuất hiện nhiều rễ mới, hỗn hợp giá thể này có độ thoáng khí, bộ rễ có thể hô hấp tốt đồng thời vẫn có khả năng giữ ẩm tốt, nâng cao hiệu quả ra cây. Như vậy, trên nền giá thể gồm rêu rừng, đá bọt núi lửa và xơ dừa (tỷ lệ 30:30:40) có độ thoáng và giữ ẩm thích hợp cho cây con thích nghi và sinh trưởng.

4. Kết luận

Kết quả nghiên cứu cho thấy, môi trường nhân nhanh protocorm tối ưu là MS bổ sung 2 mg/l BAP, 1 mg/l IBA, 40 g/l dịch nghiền chuối.

Môi trường thích hợp nhất cho tái sinh chồi từ protocorm là MS bổ sung 1,5 mg/l KIN, 30 g/l dịch nghiền cà rốt.

Môi trường MS bổ sung 30 g/l dịch nghiền cà rốt, 1 mg/l α NAA thích hợp cho cây *in vitro* tạo rễ, với số rễ đạt được cao nhất là 10,8 rễ/cây.

Giá thể phù hợp nhất cho cây con ở giai đoạn vườn ươm là hỗn hợp rêu rừng, đá bọt núi lửa và xơ dừa (tỷ lệ 30:30:40) cho tỷ lệ cây con sống đạt (96,6%), cây to khỏe, lá xanh đậm, ra rễ mới nhiều, rễ xanh.

LỜI CẢM ƠN

Các tác giả xin chân thành cảm ơn Viện Ứng dụng Công nghệ, Bộ Khoa học và Công nghệ đã hỗ trợ kinh phí cho nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] C. Zhang, S.J. Liu, L. Yang, et al. (2017), "Sesquiterpene amino ether and cytotoxic phenols from *Dendrobium wardianum* Warner", *Fitoterapia*, **122**, pp.76-79, DOI: 10.1016/j.fitote.2017.08.015.

[2] Ministry of Science and Technology, Vietnamese Academy of Science and Technology (2007), *Vietnam Red Data Book. Part II. Plants*, Natural Science and Technology Publishing House, pp.438-439 (in Vietnamese).

[3] S.M. Abbaszadeh, S.M. Miri, R. Naderi (2018), "An effective nutrient medium for asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of phalaenopsis 'Bahia Blanca'", *Journal of Ornamental Plants*, **8(3)**, pp.183-192.

[4] S. Paul, S. Kumaria, P. Tandon (2012), "An effective nutrient medium for asymbiotic seed germination and large scale *in vitro* regeneration of *Dendrobium hookerianum* a threatened orchid of northeast India", *AOB Plants*, **2012**, DOI: 10.1093/aobpla/plr012.

[5] Y. Hasanah, L. Mawarni, C. Hanum (2020), "Effect of coconut water and banana hump extract on the growth of binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) accessions from lowland", *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, **591**, DOI 10.1088/1755-1315/591/1/012004.

[6] P. Gnasekaran, X. Rathinam, U.R. Sinniah, et al. (2010), "A study on the use of organic additives on the protocorm-like bodies (PLBS) growth of *Phalaenopsis violacea* orchid", *J. Phycol.*, **2(1)**, pp.29-33.

[7] M.O. Islam, M.S. Islam, M.A. Saleh, et al. (2016), "Effect of banana extract on growth and development of protocorm like bodies in *Dendrobium* sp. orchid", *The Agriculturists*, **13(1)**, pp.101-108.

[8] E.S.W. Utami, S. Hariyanto (2019), "In vitro seed germination and seedling development of a rare Indonesian native orchid *Phalaenopsis amboinensis* J.J.Sm.", *Scientifica*, **2019**, DOI: 10.1155/2019/8105138.

[9] S. Kaur, K.K. Bhutani (2012), "Organic growth supplement stimulants for *in vitro* multiplication of *Cymbidium pendulum* (Roxb.) Sw.", *Horticultural Science (Prague)*, **39(1)**, pp.47-52.

[10] T.Q. Dan, N.M. Ly, V.C. Tuan (2018), "In vitro propagation of a precious orchid species *Renanthera imschootiana* Rolfe", *The University of Danang - Journal of Science and Technology*, **3(124)**, pp.89-93 (in Vietnamese).

[11] K.D. Sharma, S. Karki, N.S. Thakur, et al. (2012), "Chemical composition, functional properties, and processing of carrot - A review", *J. Food Sci. Tech.*, **49(1)**, pp.22-32, DOI: 10.1007/s13197-011-0310-7.

[12] D. Puchooa, R. Ramburn (2004), "A study on the use of carrot juice in the tissue culture of *Daucus carota*", *Afr. J. Biotechnol.*, **3(4)**, pp.248-252, DOI: 10.5897/AJB2004.000-2045.

[13] L.T. Vinh, T.T.L. Na, N.T.B. Thu, et al. (2022), "In vitro propagation of *Dendrobium anosmum* mutation", *Hue University Journal of Science*, **131(1A)**, pp.5-15 (in Vietnamese).

[14] A.R. Zuraida, K.H.F.L. Izzati1, O.A. Nazreena1, et al. (2013), "A simple and efficient protocol for the mass propagation of *Vanilla planifolia*", *American Journal of Plant Sciences*, **4(9)**, pp.1685-1692, DOI: 10.4236/ajps.2013.49205.

Xác định đa dạng di truyền bằng chỉ thị phân tử và khả năng tái sinh chồi *in vitro* của các giống dâu tây tại Lâm Đồng

Nguyễn Bá Nam^{1*}, Lương Vũ Mai Quỳnh¹, Lê Trinh Huy Trà¹, Lê Ngọc Triệu¹, Nguyễn Văn Bình¹, Phan Hoàng Đại¹, Lê Thế Biên^{2,3}, Trần Hiếu⁴, Hoàng Thanh Tùng², Dương Tấn Nhựt²

¹Trường Đại học Đà Lạt, 1 Phù Đổng Thiên Vương, phường 8, TP Đà Lạt, tỉnh Lâm Đồng, Việt Nam

²Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 116 Xô Viết Nghệ Tĩnh, phường 7, TP Đà Lạt, tỉnh Lâm Đồng, Việt Nam

³Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 18 Hoàng Quốc Việt, phường Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

⁴Phân hiệu Trường Đại học Nông Lâm TP Hồ Chí Minh tại Ninh Thuận, 8 Yên Ninh, thị trấn Khánh Hải, huyện Ninh Hải, tỉnh Ninh Thuận, Việt Nam

Ngày nhận bài 3/10/2022; ngày chuyển phản biện 6/10/2022; ngày nhận phản biện 25/10/2022; ngày chấp nhận đăng 29/10/2022

Tóm tắt:

Trong nghiên cứu này, đa dạng di truyền của 10 giống dâu tây được phân tích thông qua hai kỹ thuật Start codon targeted (SCoT) polymorphism và CAAT box-derived polymorphism (CBDP). Ngoài ra, mẫu lá *in vitro* của 10 giống dâu tây (Aicyberry, Kayonoka, Tochiotome, Panchika, Amauo, Pajado, Selva, Monterey, Camarosa, Albion) được sử dụng làm nguồn vật liệu ban đầu cho nghiên cứu tái sinh chồi. Kết quả cho thấy, trong tổng số 9 đoạn mỗi SCoT và 9 đoạn mỗi CBDP đã phát hiện tính đa dạng di truyền của 10 giống dâu tây. Kỹ thuật SCoT tỏ ra hiệu quả hơn với tỷ lệ band đa hình là 74,49%, cao hơn so với kỹ thuật CBDP là 71,15%. Trong khi đó, các chỉ số về đa dạng di truyền từ dữ liệu tổng hợp ở hai kỹ thuật SCoT và CBDP đạt được kết quả như sau: độ dị hợp trung đợi (H_e) là 0,2480, chỉ số Shannon (I) là 0,3749, tỷ lệ band đa hình là 75,56%. Mức độ tương đồng di truyền giữa các giống khảo sát cao nhất là 0,827 (giữa giống Aicyberry và Kayonoka), thấp nhất là 0,586 (giữa giống Aicyberry và Selva), trung bình ở mức 0,724. Ngoài ra, khi nghiên cứu khả năng tái sinh chồi của các giống dâu tây với kích thước mẫu lá nuôi cấy khác nhau cho thấy: khả năng tái sinh chồi dâu tây phụ thuộc rất lớn vào đặc tính của giống, một số giống phụ thuộc vào kích thước của mẫu cấy còn một số giống thì không phụ thuộc. Giống Camarosa với mẫu lá nuôi cấy có đường kính 3 mm cho kết quả tái sinh tốt nhất trên nền môi trường MS bổ sung 7 g/l agar, 30 g/l sucrose và 2 mg/l TDZ.

Từ khóa: CAAT box-derived polymorphism, dâu tây, đa dạng di truyền, start codon targeted, tái sinh chồi.

Chỉ số phân loại: 4.6

1. Đặt vấn đề

Cây dâu tây (*Fragaria x ananassa* Duch.) thuộc họ Hoa hồng (*Rosaceae*) được canh tác trên 71 quốc gia. Tổng sản lượng dâu tây trên toàn thế giới là 8,9 triệu tấn, trong đó, Trung Quốc dẫn đầu với 3,3 triệu tấn, chiếm 38% [1]. Dâu tây được sản xuất nhiều ở các vùng ôn đới và cận nhiệt đới, nhưng tập trung nhiều nhất ở Bắc Mỹ và châu Âu. Ở Việt Nam, dâu tây được trồng chủ yếu ở Lâm Đồng và một số tỉnh phía bắc như: Lào Cai, Sơn La, Lạng Sơn. Hiện nay, dâu tây là một trong những loại quả chiếm ưu thế hơn các loại cây ăn quả khác và được tỉnh Lâm Đồng xếp vào danh sách cây ưu tiên bởi giá trị kinh tế cũng như giá trị về mặt du lịch. Bên cạnh giống Mỹ đá (trái to, cứng, vận chuyển xa dễ dàng), thì thời gian gần đây, rất nhiều cơ sở đã tự nhập thêm một số giống dâu tây từ nhiều quốc gia khác nhau như: Nhật Bản, Hàn Quốc, Trung Quốc, Mỹ... nên không thể thống kê được chủng loại giống hiện có ở Việt Nam. Do đó, cần xác định tính đa dạng di truyền của các giống này cũng như xây dựng phương pháp nhân giống để cung cấp cho người trồng.

Việc sử dụng các chỉ thị phân tử dựa trên DNA giúp các nhà chọn giống hiểu được sự biến đổi và các mối quan hệ di truyền giữa các kiểu gen và nguồn gốc của giống [2]. Hiện nay, kỹ thuật chỉ thị phân tử DNA như RFLP, RADP, AFLPs... được sử dụng phổ biến để xác định và nhận dạng giống cây trồng. Sử dụng phương pháp so sánh đặc trưng nhận dạng DNA để xác định, nhận dạng các chủng giống cũng được sử dụng phổ biến phục vụ cho nhiều mục đích khác như công tác bảo tồn, cung cấp cây giống chuẩn. Bên cạnh đó, kỹ thuật tạo dấu vân tay DNA (DNA fingerprinting) cũng được sử dụng để đánh giá tính ổn định di truyền của cây giống qua các thế hệ nhân giống vô tính *in vitro* hoặc *ex vitro*. SCoT là một kỹ thuật đơn giản ra đời chưa lâu, nguyên lý của kỹ thuật này là tạo dấu vân tay DNA thông qua PCR bán ngẫu nhiên, sử dụng một mẫu có trình tự 5'-NNNNNNNATGNNNNNNNN-3' (trình tự cố định 5'-ATG-3' có thể nằm ở bất kỳ vị trí nào trong trình tự mẫu) để khuếch đại các phân đoạn trong bộ gen, đặc điểm của các phân đoạn được khuếch đại này là gắn liền với codon mở đầu của các gen chức năng (5'-CAT-3') [3]. Do đặc trưng dạng DNA đa locus nhận được, chỉ thị SCoT có thể được

*Tác giả liên hệ: Email: namnb@dlu.edu.vn

Genetic diversity analysis using molecular markers and *in vitro* shoot regeneration of strawberry cultivars in Lam Dong

Ba Nam Nguyen^{1*}, Vu Mai Quynh Luong¹, Trinh Huy Tra Le¹,
Ngoc Trieu Le¹, Van Binh Nguyen¹, Hoang Dai Phan¹,
The Bien Le^{2,3}, Hieu Tran⁴, Thanh Tung Hoang², Tan Nhut Duong²

¹Dalat University, 1 Phu Dong Thien Vuong Street, Ward 8, Da Lat City, Lam Dong Province, Vietnam

²Tay Nguyen Institute of Scientific Research, Vietnam Academy of Science and Technology, 116 Xo Viet Nghe Tinh Street, Ward 7, Da Lat City, Lam Dong Province, Vietnam

³Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology, 18 Hoang Quoc Viet Street, Nghia Do Ward, Cau Giay District, Hanoi, Vietnam

⁴Nong Lam University - Ho Chi Minh City, Ninh Thuan Campus,

8 Yen Ninh Street, Khanh Hai Town, Ninh Hai District, Ninh Thuan Province, Vietnam

Received 3 October 2022; revised 25 October 2022; accepted 29 October 2022

Abstract:

In the present study, start codon targeted (SCoT) polymorphism and CAAT box-derived polymorphism (CBDP) molecular markers were used to study the genetic diversity of ten strawberry cultivars. In addition, shoot regeneration from *in vitro* leaf explants of ten commercial cultivars, i.e Aicyberry, Kayonoka, Tochiotome, Penchika, Amauo, Pajado, Selva, Monterey, Camarosa, and Albion, was also investigated. The result showed that a total of 9 SCoT primers and 9 CBDP primers detected genetic polymorphism among ten strawberry cultivars. Comparatively, SCoT markers proved to be more efficient than CBDP markers in terms of percentage polymorphism as the former detected an average of 74.49% and the latter at 71.15%. Meanwhile, the indices of genetic diversity from the aggregated data of two techniques SCoT and CBDP are as follows: expected heterozygosity (H_e) 0.2480, Shannon index (I) 0.3749, polymorphic band ratio 75.56%. The highest level of genetic similarity among the cultivars was 0.827 (between Aicyberry and Kayonoka varieties), the lowest was 0.586 (between Aicyberry and Selva varieties), and the average was 0.724. In addition, the results of shoot regeneration of strawberry varieties from leaf discs with different sizes were strongly dependent on the genotype and weakly on explant size. Leaf explants (3 mm in size) of Camarosa cultivar cultured on MS medium supplemented with 7 g/l agar, 30 g/l sucrose and 2 mg/l TDZ gave the best shoot regeneration.

Keywords: CAAT box-derived polymorphism, genetic diversity, shoot regeneration, start codon targeted, strawberry.

Classification number: 4.6

ứng dụng để nghiên cứu về đa dạng di truyền các tập đoàn giống và nhận dạng, phân biệt các giống trong tập đoàn đó. CBDP cũng là kỹ thuật khuếch đại DNA bán ngẫu nhiên dựa vào PCR định hướng vào hộp CAAT trong cấu trúc promotor của các gen, trong trường hợp này trong trình tự của mỗi sử dụng có phần 5'-CCAAT-3' để nhắm vào trình tự bảo thủ cao của hộp CAAT là 5'-GGTTA-3' [4]. Hiện nay, hai kỹ thuật SCoT và CBDP được quan tâm và nghiên cứu thành công trên các đối tượng thực vật như xoài [5], trà mi hoa vàng [6]. Phương pháp thực hiện các kỹ thuật này không quá phức tạp cũng như không đòi hỏi các trang thiết bị quá đặc thù và chi phí cao... Do vậy, trong nghiên cứu này, hai kỹ thuật SCoT và CBDP được sử dụng để phân biệt một số giống dâu tây hiện có tại Lâm Đồng.

Việc phát triển cây dâu tây là một việc thiết yếu, khi nhu cầu sản xuất dâu tây càng tăng thì yêu cầu về cây giống cũng tăng theo. Phương pháp nhân giống *in vitro* được xem là biện pháp tiên tiến giúp tạo ra số lượng cây trồng lớn trong thời gian ngắn [7]. Phương pháp tái sinh từ mẫu lá là một phương pháp tiềm năng, giúp việc chọn tạo giống được rút ngắn và đồng nhất về mặt di truyền, đáp ứng được nhu cầu về số lượng lớn cây giống chất lượng cao và ổn định cho sản xuất. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định đa dạng di truyền bằng chỉ thị phân tử và khảo sát khả năng tái sinh chồi của các giống dâu tây thông qua nuôi cấy mẫu lá 10 giống dâu tây gồm: Aicyberry, Kayonoka, Tochiotome, Penchika, Amauo, Pajado, Selva, Monterey, Camarosa, Albion với các kích thước khác nhau.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Trong nghiên cứu này, 10 giống dâu tây được chia thành 2 nhóm: một nhóm có nguồn gốc từ Nhật Bản và một nhóm có nguồn gốc từ Mỹ (bảng 1).

Bảng 1. Danh sách các giống dâu tây được sử dụng trong nghiên cứu.

Tên giống	Nguồn gốc	Quang chu kỳ
Aicyberry	Nhật Bản	Trung tính
Kayonoka	Nhật Bản	Trung tính
Tochiotome	Nhật Bản	Ngày ngắn
Penchika	Nhật Bản	Trung tính
Amauo	Nhật Bản	Trung tính
Pajado	Mỹ	Trung tính
Selva	Mỹ	Trung tính
Monterey	Mỹ	Trung tính
Camarosa	Mỹ	Ngày ngắn
Albion	Mỹ	Trung tính

Các mẫu lá của cây dâu tây *in vitro* được nuôi cấy từ đỉnh sinh trưởng của các giống dâu tây 1 năm tuổi. Các giống dâu tây này được cung cấp bởi Viện Nghiên cứu và Ứng dụng Nông nghiệp Công nghệ cao thuộc Trường Đại học Đà Lạt.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp tạo nguồn mẫu ban đầu: Chồi có chứa đỉnh sinh trưởng cây dâu tây được khử trùng với cồn 70% (v/v) trong vòng 30 giây và HgCl_2 0,1% (w/v) trong vòng 5 phút, sau đó rửa 4 lần với nước cất vô trùng. Tách đỉnh sinh trưởng và cấy vào bình thủy tinh 250 ml chứa 40 ml môi trường MS [8], bổ sung 0,3 mg/l BA, 30 g/l sucrose và 8,5 g/l agar. Sau đó sử dụng các mẫu lá của cây dâu tây *in vitro* trên cho tất cả các nghiệm thức. Mẫu lá *in vitro* được nuôi cấy trong bình thủy tinh 250 ml chứa 30 ml môi trường MS bổ sung 2 mg/l TDZ, 7 g/l agar và 30 g/l sucrose [9] đã được hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C, áp suất 1 atm trong thời gian 30 phút. Các bình nuôi cấy được nuôi trong phòng nuôi cấy với nhiệt độ khoảng $25 \pm 2^\circ\text{C}$, độ ẩm tương đối khoảng 60%, được đặt dưới ánh sáng đèn huỳnh quang với quang chu kỳ 16 giờ/ngày, cường độ chiếu sáng là $40\text{--}45 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Nhận dạng, xác định quan hệ di truyền và đánh giá đa dạng di truyền các giống dâu tây thông qua kỹ thuật SCoT và CBDP: Mẫu lá *in vitro* (5 g) của 10 giống dâu tây được thu nhận và sử dụng làm nguồn vật liệu để tách chiết DNA. Các mẫu lá tươi được tách chiết DNA tổng số theo quy trình CTAB cải tiến dựa trên cải biến quy trình CTAB I của K. Weising và cs (2005) [10]. Kiểm tra nồng độ, chất lượng DNA bằng phương pháp đo mật độ quang dựa trên giá trị $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ nằm trong khoảng 1,8 đến 2,0 để xác định độ tinh sạch theo phương pháp của K. Weising và cs (2005) [10], sau đó, pha loãng về nồng độ 100 ng/ μl để sử dụng làm mẫu (template) trong quá trình PCR về sau. 15 môi SCoT và 15 môi CBDP tham khảo từ hai nghiên cứu tương ứng của B.C.Y. Collard và cs (2009) [3] và A.K. Singh và cs (2014) [4] được làm vật liệu môi. Tiêu chí để sàng lọc môi là ghi nhận được sản phẩm khuếch đại bằng PCR và có ít nhất một băng đa hình trên 5 mẫu ngẫu nhiên từ tập hợp mẫu khảo sát. Sau quá trình khảo sát, 6 môi SCoT và 6 môi CBDP không xác định được kết quả do số band bị mờ không rõ. Do đó, có 9 môi SCoT và 9 môi CBDP hình thành nên band rõ ràng được chọn làm vật liệu môi để khuếch đại các đoạn DNA mục tiêu (bảng 2).

Bảng 2. Các môi Start codon targeted và CAAT box-derived polymorphism khảo sát.

Thứ tự	Tên môi	Trình tự môi (5'-3')	Nhiệt độ gắn môi (°C)	Tài liệu tham khảo
Sử dụng trong kỹ thuật SCoT				
1	SCoT 3	CAACA <u>AT</u> GGCTACCACCG	50	[3]
2	SCoT 12	ACGAC <u>AT</u> GGCGACCAACG	50	
3	SCoT 13	ACGAC <u>AT</u> GGCGACCATCG	50	
4	SCoT 18	ACC <u>AT</u> GGCTACCACCGCC	50	
5	SCoT 19	ACC <u>AT</u> GGCTACCACCGGC	50	
6	SCoT 22	AACC <u>AT</u> GGCTACCACCAC	50	
7	SCoT 23	CACC <u>AT</u> GGCTACCACCAG	50	
8	SCoT 29	CC <u>AT</u> GGCTACCACCGGCC	50	
9	SCoT 30	CC <u>AT</u> GGCTACCACCGGCG	50	
Sử dụng trong kỹ thuật CBDP				
1	CBDP 2	TGAGCACGAT <u>CCAATA</u> AT	50	[4]
2	CBDP 3	TGAGCACGAT <u>CCAAT</u> ACC	50	
3	CBDP 5	TGAGCACGAT <u>CCAAT</u> CTA	50	
4	CBDP 8	TGAGCACGAT <u>CCAAT</u> CGG	50	
5	CBDP 9	TGAGCACGAT <u>CCAAT</u> GAT	50	
6	CBDP 10	TGAGCACGAT <u>CCAAT</u> GTT	50	
7	CBDP 11	TGAGCACGAT <u>CCAAT</u> TGC	50	
8	CBDP 12	TGAGCACGAT <u>CCAAT</u> ATA	50	
9	CBDP 14	TGAGCACGAT <u>CCAAT</u> GCG	50	

Phản ứng PCR được thực hiện với dung tích 50 μl chứa 25 μl 2X My HS Mix, 5 μl mỗi 10 pmol/ μl BSA 1 μl 50 ng khuôn mẫu DNA theo khuyến cáo của nhà sản xuất (kit MyTaqTM HS Mix, 2x, Hãng Bioline). Quá trình khuếch đại DNA được thực hiện trên hệ máy luân nhiệt Eppendorf Mastercycler Pro S (Hãng Eppendorf, Đức) với chu trình nhiệt sử dụng cho từng kỹ thuật như sau:

Kỹ thuật SCoT được thực hiện theo phương pháp của B.C.Y. Collard và cs (2009) [3] gồm các bước: biến tính ban đầu ở 94°C trong 5 phút; 36 chu kỳ gồm 94°C trong 45 giây, 50°C trong 45 giây, 72°C trong 1 phút 30 giây; bước kéo dài mạch cuối cùng ở 72°C trong 15 phút; bảo quản ở 4°C .

Kỹ thuật CBDP được thực hiện theo phương pháp của A.K. Singh và cs (2014) [4] gồm các bước: biến tính ban đầu ở 94°C trong 6 phút; 5 chu kỳ gồm 94°C trong 45 giây, 35°C trong 45 giây, 72°C trong 1 phút 20 giây và 35 chu kỳ

gồm 94°C trong 45 giây, 50°C trong 45 giây, 72°C trong 1 phút 20 giây; bước kéo dài mạch cuối cùng ở 72°C trong 10 phút; bảo quản ở 4°C.

Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 2% ở điện thế 80 V trong 2 giờ. Sau khi chạy điện di, lấy bản gel nhuộm với Ethidium Bromide (EtBr) và quan sát dưới ánh sáng cực tím (UV) và chụp ảnh trên hệ thiết bị UVP Gel Studio PLUS (Hãng Analytik Jena, Đức).

2.3. Tái sinh chồi dâu tây từ lá in vitro

Mẫu lá dâu tây của 10 giống (Aicyberry, Kayonoka, Tochtotome, Penchika, Amauo, Pajado, Selva, Monterey, Camarosa, Albion) *in vitro* được cắt bằng dụng cụ inox đục lỗ tròn lần lượt ở các đường kính 3, 5 và 7 mm nhằm khảo sát ảnh hưởng kích thước mẫu đến khả năng tái sinh của mẫu cấy.

2.4. Chỉ tiêu theo dõi và xử lý thống kê

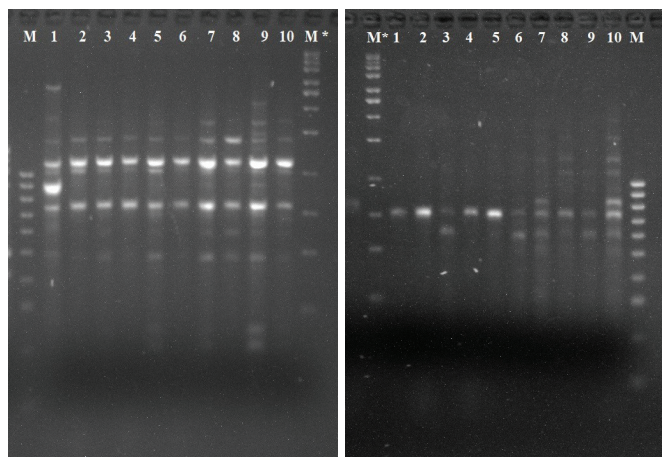
Phân tích kết quả đa dạng di truyền sử dụng phần mềm Popgene 32 để tính toán các thông số của các mẫu đại diện cho tập hợp 10 mẫu khảo sát, bao gồm tỷ lệ band đa hình (PPB), độ dị hợp trông đợi (H_e) và chỉ số Shannon (I) [11]. Phần mềm NTSys để tính toán chỉ số tương đồng di truyền giữa các mẫu khảo sát và xây dựng cây quan hệ di truyền giữa các mẫu khảo sát [12].

Chỉ tiêu theo dõi là tỷ lệ tái sinh chồi (%), số chồi/mẫu (chồi), khối lượng tươi mẫu, hình thái chồi để khảo sát khả năng cảm ứng tạo mô sẹo và tái sinh chồi sau 6 tuần nuôi cấy trên môi trường agar với mỗi giống và kích thước khác nhau. Mỗi thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên hai yếu tố. Mỗi thí nghiệm lặp lại 3 lần để tính trung bình mỗi lần thực hiện với 15 mẫu lá. Tất cả số liệu thu nhận sẽ được xử lý bằng phần mềm Minitab 18.0 theo phương pháp Turkey's test.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Tính đa dạng và mức độ tương đồng di truyền của các giống dâu tây thông qua kỹ thuật Start codon targeted và CAAT box-derived polymorphism

Mẫu lá *in vitro* từ 10 giống dâu đã được tách chiết DNA thành công với nồng độ DNA của các mẫu đạt trong khoảng 400-900 ng/ μ l, độ tinh sạch được thể hiện qua chỉ số OD₂₆₀/OD₂₈₀ đều dao động trong khoảng 1,8-2,0. Ngoài ra, kết quả PCR trên ảnh điện di của mỗi SCoT 30 và mỗi CBDP 10 với 10 mẫu dâu tây được thể hiện ở hình 1 là 2/18 mỗi, bao gồm 9 mỗi SCoT và 9 mỗi CBDP có tính đa hình thể hiện hình ảnh rõ ràng và có khả năng khuếch đại các đoạn DNA mục tiêu. Các thông số đa hình của các môi được xác định dựa trên hai kỹ thuật SCoT và CBDP thể hiện ở bảng 3.



Hình 1. Kết quả PCR của mỗi Start codon targeted 30 (trái) và CAAT box-derived polymorphism 10 (phải) với 10 mẫu DNA dâu tây. M: thước 100 bp (HyperLadder™ 100 bp, Hãng Bioline); M*: thước 1 kb (innuSTAR 1 kb DNA Ladder Express, Hãng Analytikjena); 1: Aicyberry; 2: Kayonoka; 3: Penchika; 4: Tochtotome; 5: Pajado; 6: Amauo; 7: Monterey; 8: Camarosa; 9: Selva; 10: Albion.

Bảng 3. Các thông số đa hình của các môi trên hai kỹ thuật Start codon targeted và CAAT box-derived polymorphism với 10 giống dâu tây.

Thứ tự	Kỹ thuật SCoT			Kỹ thuật CBDP		
	Môi	Số lượng band đa hình	Tỷ lệ band đa hình (%)	Môi	Số lượng band đa hình	Tỷ lệ band đa hình (%)
1	SCoT 3	11	90,90	CBDP 2	9	66,67
2	SCoT 12	23	82,61	CBDP 3	11	54,54
3	SCoT 13	24	70,83	CBDP 5	9	77,78
4	SCoT 18	13	53,85	CBDP 8	10	90,00
5	SCoT 19	13	84,61	CBDP 9	7	28,57
6	SCoT 22	14	57,14	CBDP 11	8	75,00
7	SCoT 23	12	83,33	CBDP 12	9	77,78
8	SCoT 29	18	72,22	CBDP 14	10	80,00
9	SCoT 30	16	75,00	CBDP 10	10	90,00
Tổng		144			83	
Trung bình		16	74,49		9,22	71,15

Khi tiến hành phản ứng khuếch đại giữa 9 môi SCoT và 9 môi CBDP với 10 giống dâu tây, kết quả đối với 9 môi SCoT thu nhận được tổng 144, tỷ lệ đa hình cao nhất ở môi SCoT 3 với 90,90%. Số band cho mỗi môi dao động từ 11 đến 24 band. Số band trung bình cho từng môi được ghi nhận là 16 band/môi với tỷ lệ đa hình trung bình đạt 74,49%. Trong khi đó, 9 môi CBDP thu được tổng 83 band đa hình, số band dao động 7-11. Số band trung bình cho từng môi là 9,22 band/môi với tỷ lệ đa hình trung bình là 71,15%.

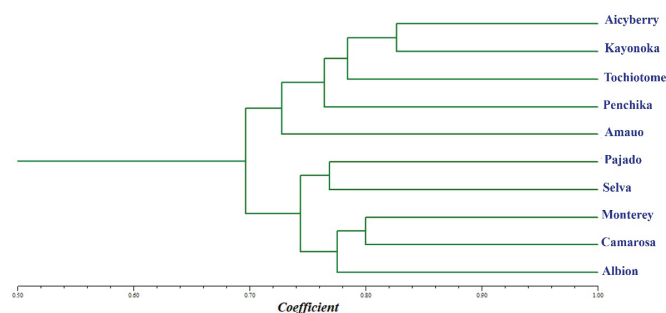
Kết quả phân tích ma trận tương đồng cho thấy, mức độ tương đồng di truyền giữa các giống đạt khá cao, trung bình ở mức 0,724. Mức cao nhất là 0,827 (giữa giống Aicyberry và Kayonoka), thấp nhất là 0,586 (giữa giống Aicyberry và

Selva). Tương đồng di truyền giữa 10 giống dâu tây khảo sát dựa trên phối hợp cả hai kỹ thuật SCoT và CBDP được thể hiện ở bảng 4.

Bảng 4. Tương đồng di truyền giữa các giống dựa trên hai kỹ thuật Start codon targeted và CAAT box-derived polymorphism.

	Aicyberry	Kayonoka	Penchika	Tochiotome	Pajado	Amauo	Monterey	Camarosa	Selva
Kayonoka	0,827								
Penchika	0,697	0,817							
Tochiotome	0,742	0,826	0,777						
Pajado	0,693	0,795	0,755	0,782					
Amauo	0,640	0,760	0,746	0,764	0,715				
Monterey	0,635	0,746	0,724	0,688	0,791	0,711			
Camarosa	0,640	0,724	0,702	0,657	0,715	0,697	0,800		
Selva	0,586	0,662	0,666	0,648	0,768	0,635	0,791	0,697	
Albion	0,653	0,746	0,706	0,706	0,746	0,737	0,777	0,773	0,720

Dựa trên sự phối hợp hai bộ dữ liệu hình thành bằng kỹ thuật SCoT và CBDP, kết quả tính toán tỷ lệ band đa hình (PPB), độ dị hợp trông đợi (H_e) và chỉ số Shannon (I) dựa trên tính toán bằng phần mềm Popgene 32. Các chỉ số về đa dạng di truyền từ dữ liệu tổng hợp ở hai kỹ thuật SCoT và CBDP như sau: $H_e=0,2480$; $I=0,3749$; PPB=75,56%. Dựa trên hệ số tương đồng di truyền giữa các giống dâu tây khảo sát trên hai kỹ thuật SCoT và CBDP, cây quan hệ di truyền được thể hiện ở hình 2.



Hình 2. Sơ đồ dạng cây về quan hệ di truyền giữa các cá thể khảo sát dựa trên hai kỹ thuật Start codon targeted và CAAT box-derived polymorphism.

Qua sơ đồ cây ở hình 2 nhận thấy 10 giống dâu tây chia thành 2 nhóm. Tương đồng di truyền của cả hai nhóm 1 và 2 trên mức 0,700. Nhóm 1 bao gồm các giống Aicyberry, Kayonoka, Tochiotome, Penchika, Amauo với hệ số tương đồng thấp nhất (khoảng 0,725). Trong khi đó, nhóm 2 bao gồm các giống Pajado, Selva, Monterey, Camarosa, Albion với hệ số tương đồng khoảng 0,745. Các giống Aicyberry, Kayonoka, Tochiotome có mức độ tương đồng tương đối cao và cùng nhóm 1 vì cùng xuất xứ là dâu tây có nguồn gốc Nhật Bản. Trong nhóm này, giống Aicyberry và Kayonoka có mối quan hệ chặt chẽ về mặt di truyền (đạt 0,83). Trong khi Aicyberry và Selva có giá trị tương đồng thấp nhất thuộc

2 nhóm khác nhau, vì Aicyberry là giống dâu tây có nguồn gốc xuất xứ Nhật Bản còn Selva là giống dâu tây có nguồn gốc xuất xứ từ Mỹ. Điều này cho thấy, các giống dâu tây khác nhau về mặt di truyền phân bố theo nguồn gốc xuất xứ.

Đối với các giống Penchika, Selva, Albion, Monterey cùng là giống dâu tây có xuất xứ từ Mỹ nhưng vẫn có sự khác biệt về mặt di truyền. Các giống dâu tây này có sự khác biệt như vậy có thể là do quá trình lai tạo từ những nguồn vật liệu khác biệt di truyền lớn trong việc chọn tạo giống. Bên cạnh đó cũng không loại trừ khả năng biến động di truyền (trình tự DNA có thể biến đổi) trong quá trình canh tác quá lâu nên xảy ra lai tạp. Như vậy, các mẫu giống dâu tây khá đa dạng, có thể cho lai các giống giữa nhóm 1 và nhóm 2, tạo ra các sản phẩm mới và chất lượng, phục vụ công tác sản xuất và chọn tạo giống.

3.2. Tái sinh chồi từ mẫu lá dâu tây *in vitro*

Với mục đích hoàn thiện quy trình nhân giống, thí nghiệm tái sinh chồi từ mẫu lá dâu tây *in vitro* được tiến hành nhằm đánh giá khả năng tạo chồi bất định của từng giống, góp phần chứng minh giữa các giống khác nhau có sự khác biệt trong quá trình tái sinh và xác định các yếu tố ảnh hưởng đến chúng. Giai đoạn tạo nguồn mẫu ban đầu là quan trọng để khởi đầu cho một quy trình nhân giống. Trong trường hợp số lượng giống ban đầu còn hạn chế hoặc chỉ chọn được 1-2 cá thể có tính trạng tốt thì phương pháp tái sinh chồi từ mẫu lá là tối ưu. Ngoài ra, việc xác định kích thước mẫu cho quá trình tái sinh là tiền đề quan trọng cho những nghiên cứu chọn giống bằng phương pháp chuyển gen, xử lý hoá chất hoặc chiếu xạ. Trong nghiên cứu này, sự tái sinh chồi của mẫu lá 10 giống dâu tây ở 3 kích thước khác nhau (3, 5, 7 mm) được ghi nhận (bảng 4). Mẫu lá sau 1 tuần đã xuất hiện cảm ứng và thấy mô sẹo hình thành xung quanh vết cắt sau đó lan dần đến toàn bộ bề mặt lá. Kết quả này cho thấy, sự khác nhau về tỷ lệ tái sinh chồi giữa các giống là đáng kể, dao động từ 0,00 đến 93,09%. Trong đó, tỷ lệ tái sinh cao nhất là 93,09% xảy ra ở giống Camarosa ở kích thước 3 mm. Đồng thời, giống Amauo cũng có tỷ lệ tái sinh là 93,09% nhưng lại ở kích thước 7 mm. Tuy nhiên, giống Camarosa có chồi lớn hơn, chắc khỏe và đồng đều hơn. Trong khi đó, giống dâu tây có tỷ lệ tái sinh ít nhất là giống Aicyberry với tỷ lệ tái sinh là 0,00% trên cả 3 kích thước khác nhau. Với giống Aicyberry, đa số vết thương không có khả năng tái sinh, dễ bị hoại tử, hóa đen hoặc có cảm ứng mô sẹo, mô sẹo có màu xanh nhưng không nhiều và chưa tạo chồi sau 6 tuần nuôi cấy. Điều này cho thấy, sự khác nhau về giống, kích thước có ảnh hưởng lớn đến khả năng tái sinh. Kiểu gen là một trong những yếu tố quyết định chính cho sự hình thành và phát triển của

chồi. Trong nghiên cứu này có sự khác biệt về hình thành mô sẹo và số lượng chồi/mẫu. Mặc dù, tỷ lệ tái sinh của Amauo thấp hơn Camarosa nhưng số chồi/mẫu của Amauo cao hơn Camarosa. Ngoài ra, giống Aicyberry cũng như tỷ lệ tái sinh cho số chồi/mẫu là thấp nhất. Xét về kích thước thì nghiệm thức này cũng không có sự khác biệt quá lớn, tuy nhiên, kích thước 3 và 5 mm vẫn cho tỷ lệ cao hơn.

Bảng 5. Khả năng tái sinh chồi từ mẫu lá của 10 giống dâu tây sau 6 tuần nuôi cấy.

Giống	Ø (mm)	Tỷ lệ tái sinh chồi (%)	Số chồi/mẫu	Tỷ lệ chồi >0,5 cm (%)	Khối lượng mẫu (mg)		Hình thái
					Tươi	Khô	
Camarosa	3	93,09 ^a	4,99 ^{a-d}	4,10	319,55 ^{a-c}	38,25 ^{a-c}	Chồi lớn, phần lá cup, tái sinh không đồng đều
	5	85,54 ^a	3,94 ^{a-d}	2,27	378,97 ^{ab}	40,72 ^{a-c}	Chồi mảnh, phần lá xòe, mô sẹo dễ vỡ
	7	76,94 ^{ab}	3,93 ^{a-d}	5,17	573,10 ^a	62,38 ^a	Chồi lớn, có cuống lá, phần lá xẻ thùy
Aicyberry	3	-	-	-	18,34 ^b	8,91 ^f	Mô bị hoại tử
	5	-	-	-	56,44 ^{a-b}	27,70 ^{e-f}	Mô bị hoại tử
	7	-	-	-	141,18 ^{a-b}	37,29 ^{e-f}	Mô bị hoại tử
Kayonoka	3	10,06 ^{c-e}	0,54 ^d	2,08	48,78 ^{c-h}	18,95 ^{d-g}	Chồi ít nhưng đôi lớn, lá màu xanh đậm, có cuống lá, phần lá xòe
	5	-	-	-	45,36 ^{d-h}	20,72 ^{c-g}	Mô hoại tử
	7	-	-	-	78,00 ^{a-h}	31,24 ^{a-g}	Mô hoại tử
Selva	3	28,12 ^{a-c}	3,45 ^{a-d}	-	55,60 ^{a-h}	16,10 ^g	Chồi nhỏ, không đồng đều, phần lá cup
	5	56,96 ^{a-c}	4,56 ^{a-d}	2,69	115,71 ^{b-h}	26,84 ^{a-g}	Chồi lớn, chồi có hình thái rõ ràng
	7	43,32 ^{a-d}	3,47 ^{a-d}	-	118,96 ^{a-b}	28,88 ^{a-g}	Mô sẹo nhiều, chồi nhỏ, phần hóa rõ ràng
Tochiotome	3	-	-	-	33,37 ^h	10,85 ^h	Mô sẹo hóa đen
	5	3,42 ^h	0,06 ^d	-	30,32 ^h	13,49 ^{c-g}	Mô sẹo ít, đa số mô sẹo hóa đen
	7	-	-	-	71,41 ^{d-h}	20,73 ^{c-g}	Mô sẹo hóa đen
Penchika	3	65,16 ^{a-c}	4,35 ^{a-d}	-	138,03 ^{b-h}	27,73 ^{a-g}	Chồi nhỏ, li ti, có cuống lá, phần lá cup
	5	73,01 ^{ab}	7,22 ^{a-c}	-	215,59 ^{a-g}	39,75 ^{a-c}	Chồi tái sinh nhiều, nhỏ, đồng đều, phần lá xòe
	7	76,94 ^{ab}	3,93 ^{a-d}	0,58	287,82 ^{a-d}	57,17 ^{ab}	Chồi lớn, tái sinh nhiều, đồng đều, có cuống lá, phần lá xòe
Pajado	3	72,21 ^{ab}	4,35 ^{a-d}	1,40	168,99 ^{b-h}	31,90 ^{a-g}	Chồi lớn, có cuống lá, phần lá xòe, chồi chắc khỏe, lá có màu xanh đậm
	5	38,23 ^{a-d}	1,43 ^{b-c}	-	235,43 ^{a-f}	42,68 ^{a-d}	Chồi lớn, có cuống lá, phần lá xòe, chồi chắc khỏe
	7	32,59 ^{a-c}	2,34 ^{a-d}	1,12	272,41 ^{a-c}	54,26 ^{a-c}	Chồi lớn, không đồng đều, có cuống lá, phần lá xòe, chồi chắc khỏe

Sau 6 tuần nuôi cấy, tỷ lệ chồi cao hơn 0,5 cm xuất hiện với tỷ lệ rất thấp ở các giống. Tuy tỷ lệ tái sinh của giống Amauo không cao bằng giống Camarosa nhưng lại có tỷ lệ chồi cao hơn 0,5 cm cao nhất, đặc biệt cảm ứng mạnh ở đường kính 3 mm. Theo sau đó là giống Camarosa đạt tỷ lệ 3,75%. Chiều cao của chồi cũng không có sự khác biệt lớn giữa các nghiệm thức này (bảng 5).

Giống	Ø (mm)	Tỷ lệ tái sinh chồi (%)	Số chồi/mẫu	Tỷ lệ chồi >0,5 cm (%)	Khối lượng mẫu (mg)		Hình thái
					Tươi	Khô	
Albion	3	3,42 ^{de}	0,06 ^d	-	62,81 ^{d-h}	14,53 ^{d-g}	Chồi nhỏ li ti, chưa phân hóa rõ ràng
	5	-	-	-	72,26 ^{d-h}	18,80 ^{d-g}	Mô bị hoại tử
	7	-	-	-	128,32 ^{b-h}	30,90 ^{a-g}	Mô bị hoại tử
Monterey	3	58,87 ^{a-c}	3,80 ^{a-d}	-	41,19 ^{g-h}	10,81 ^f	Chồi nhỏ, phần hóa rõ ràng
	5	66,35 ^{a-c}	9,34 ^{ab}	1,36	201,71 ^{b-g}	38,26 ^{a-c}	Chồi cao lớn, chắc khỏe, phần hóa rõ ràng
	7	14,48 ^{b-c}	1,25 ^{cd}	1,44	149,81 ^{b-h}	34,14 ^{a-g}	Chồi nhỏ, mảnh
Amauo	3	49,77 ^{a-d}	2,71 ^{a-d}	6,10	156,25 ^{b-h}	23,17 ^g	Chồi nhỏ, chắc khỏe, có cuống lá, xẻ thùy, lá xanh đậm
	5	38,23 ^{a-d}	3,08 ^{a-d}	3,94	168,50 ^{a-h}	29,21 ^{a-g}	Chồi cao lớn, chắc khỏe, lá xanh đậm
	7	93,09 ^a	9,61 ^a	4,03	322,42 ^{a-c}	41,93 ^{a-c}	Chồi cao lớn, chắc khỏe, lá xanh đậm, không đồng đều
Trung bình giống							
Camamosa		85,09 ^a	4,27 ^a	3,75 ^{ab}	417,34 ^a	46,54 ^a	
Aicyberry		-	-	-	62,40 ^{cd}	22,94 ^{cd}	
Kayonoka		1,92 ^b	0,16 ^b	0,51 ^{bc}	56,51 ^{cd}	23,34 ^{cd}	
Selva		41,98 ^a	3,81 ^a	0,64 ^{bc}	94,28 ^{cd}	23,60 ^{cd}	
Tochiotome		0,78 ^b	0,02 ^b	-	43,31 ^d	14,75 ^d	
Penchika		71,65 ^a	5,08 ^a	0,17 ^c	209,22 ^b	40,68 ^{ab}	
Pajado		46,20 ^a	2,59 ^a	0,75 ^{a-c}	223,45 ^b	42,46 ^a	
Albion		0,78 ^b	0,02 ^b	-	223,45 ^b	20,89 ^{cd}	
Monterey		42,83 ^a	4,24 ^a	0,83 ^{a-c}	120,05 ^{bc}	26,11 ^{b-d}	
Amauo		58,23 ^a	4,73 ^a	4,64 ^a	209,70 ^b	30,97 ^{a-c}	
Kích thước trung bình							
Ø 3		27,69	1,99	0,92	88,40 ^c	19,08 ^c	
Ø 5		24,66	1,99	0,75	133,9 ^b	28,98 ^b	
Ø 7		20,98	1,82	0,88	193,30 ^a	38,86 ^a	
Nguồn biến động							
Giống * Ø		*	*	***	***	***	
Giống		***	***	ns	***	***	
Ø		ns	ns	ns	**	**	

*: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001; n.s. not significant. Những chữ cái khác nhau (a, b, c...) được nêu trong các cột biểu diễn trong Tukey's test.

Tái sinh chồi từ lá dâu tây được thực hiện trong nhiều nghiên cứu với các điều kiện khác nhau như: chất điều hoà sinh trưởng [13], điều kiện nuôi cấy [14], giống và loại mẫu [15]. Trong nghiên cứu này, kích thước và giống của mẫu lá khác nhau sẽ cho các kết quả tái sinh khác nhau. Mẫu lá mang kích thước 3 và 5 mm cho khả năng tái sinh chồi với số chồi và tỷ lệ tái sinh tốt hơn ở mẫu cây có kích thước 7 mm. Khối lượng tươi và khối lượng khô đạt cao nhất ở tất cả mẫu cây 7 mm ở hầu hết các giống (trừ giống dâu tây Monterey). Điều này cho thấy, khi diện tích tiếp xúc của vết thương lá càng nhiều thì tỷ lệ cảm ứng mô sẹo càng cao, dẫn đến làm tăng sinh khối của cụm chồi. Tóm lại, kết quả nghiên cứu cho thấy khả năng tái sinh chồi dâu tây phụ thuộc rất lớn vào đặc tính của giống, kích thước của mẫu cây.

4. Kết luận

Kết quả phân tích đa dạng di truyền của 10 giống dâu tây với chỉ thị SCoT và CBDP cho thấy hiệu quả của việc ứng dụng các kỹ thuật này trong xây dựng hệ thống dữ liệu phân tử đối với các giống và loài thực vật. Nghiên cứu này là cơ sở để đánh giá tính đa dạng di truyền giữa các cá thể trong cùng một giống, khi kết hợp với kết quả của nghiên cứu tái sinh từ mẫu lá sẽ giúp phục vụ tốt hơn công tác chọn giống dâu tây. Xa hơn nữa, kết quả nghiên này có thể ứng dụng trong truy xuất nguồn gốc giống của các sản phẩm dâu tây trên thị trường.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Food and Agriculture Organization (2019), *FAO Stat*, <https://www.fao.org/faostat/en/#home>, accessed 25 December 2019.
- [2] V.M. Whitaker (2011), “Applications of molecular markers in strawberry”, *Journal of Berry Research*, **1**(3), pp.115-127, DOI: 10.3233/BR-2011-013.
- [3] B.C.Y. Collard, D.J. Mackill (2009), “Start codon targeted (SCoT) polymorphism: A simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants”, *Plant Molecular Biology Reporter*, **27**, pp.86-93, DOI: 10.1007/s11105-008-0060-5.
- [4] A.K. Singh, M.K. Rana, S. Singh, et al. (2014), “CAAT box-derived polymorphism (CBDP): A novel promoter-targeted molecular marker for plants”, *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, **23**(2), pp.175-183, DOI: 10.1007/s13562-013-0199-5.
- [5] N.T. Nha, L.T. Thanh, V.T.H. Trang (2021), “Genetic diversity of mango cultivars in Central and Southern Vietnam using start codon target (SCoT) marker”, *Journal of Agriculture and Rural Development*, **18**, pp.113-120 (in Vietnamese).
- [6] L.N. Trieu, T.T. Bich, N.V. Ket (2022), “Population genetic diversity of *Camellia dilinhensis* on the Di Linh Plateau of Vietnam revealed by ISSR and Scot markers”, *Dalat University Journal of Science*, **12**(3), pp.43-55, DOI: 10.37569/DalatUniversity.12.3.954(2022).
- [7] C.S. Mattick (2018), “Cellular agriculture: The coming revolution in food production”, *Science Bulletin*, **74**(1), pp.32-35, DOI: 10.1080/00963402.2017.1413059.
- [8] T. Murashige, F. Skoog (1962), “A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures”, *Physiologia Plantarum*, **15**(3), pp.473-497, DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
- [9] S. Yin, W. Jin, P. Wang, et al. (2003), “Effects of thidiazuron (TDZ) on inducing adventitious shoot of strawberry *in vitro*”, *Journal of Agricultural Biotechnology*, **1**(4), pp.379-382 (in Chinese with English abstract).
- [10] K. Weising, H. Nybom, M. Pfenninger, et al. (2005), *DNA Fingerprinting in Plants: Principles, Methods, and Applications*, CRC Press, 472pp.
- [11] F. Yeh, R.C. Yang, T.B.J. Boyle, et al. (2000), “PopGene32, microsoft windows-based freeware for population genetic analysis, version 1.32”, *Science Open*, <https://www.scienceopen.com/document?vid=2d45ad78-b140-4b66-b80f-2c9f513ec997>, accessed 24 July 2022.
- [12] F.J. Rohlf (2000), “NTSYSpc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system version 2.11x”, *Science Open*, <https://www.scienceopen.com/book?vid=40c2e0a8-f43d-4a9b-9414-6bf32f3fbc1a>, accessed 24 July 2022.
- [13] F. Haddadi, M.A. Aziz, H. Kamaladini, et al. (2013), “Thidiazuron-and zeatin-induced high-frequency shoot regeneration from leaf and shoot-tip explants of strawberry”, *HortTechnology*, **23**(3), pp.276-281.
- [14] H. Wang, M. Li, Y. Yang, et al. (2015), “Histological and endogenous plant growth regulators changes associated with adventitious shoot regeneration from *in vitro* leaf explants of strawberry (*Fragaria × ananassa* cv. ‘Honeoye’)”, *Plant Cell Tissue Organ Culture*, **123**, pp.479-488, DOI: 10.1007/s11240-015-0851-y.
- [15] A. Passey, K. Barrett, D. James (2003), “Adventitious shoot regeneration from seven commercial strawberry cultivars (*Fragaria × ananassa* Duch.) using a range of explant types”, *Plant Cell Reports*, **21**(5), pp.397-401, DOI: 10.1007/s00299-002-0530-4.

Hiệu quả hiệp đồng kháng nấm gây hại vật liệu gỗ của hoạt chất preventol, α -bromo-cinnamaldehyde và đồng sunfat

Nguyễn Vũ Hùng¹, Trần Khánh Linh^{2,3}, Nguyễn Thị Thanh Lợi^{3,4}, Lê Trọng Tài⁵, Ngô Cao Cường^{2*}

¹Công ty TNHH MTV Cơ điện và Vật liệu nỏ 31, phường Bãi Bông, TP Phố Yên, tỉnh Thái Nguyên, Việt Nam

²Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga, Bộ Quốc phòng, 63 Nguyễn Văn Huyền, phường Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

³Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 18 Hoàng Quốc Việt, phường Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

⁴Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 18 Hoàng Quốc Việt, phường Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

⁵Cục Phát triển Công nghệ và Đổi mới Sáng tạo, Bộ Khoa học và Công nghệ, 113 Trần Duy Hưng, phường Trung Hòa, quận Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 8/12/2023; ngày chuyển phản biện 12/12/2023; ngày nhận phản biện 29/12/2023; ngày chấp nhận đăng 4/1/2024

Tóm tắt:

Mục tiêu của nghiên cứu nhằm đánh giá khả năng kháng các chủng nấm gây hại gỗ mạnh (*in vitro*) của 3 đơn hoạt chất preventol, α -bromo-cinnamaldehyde (α -BCA) và đồng sunfat, đồng thời đánh giá hiệu quả hiệp đồng của công thức chế phẩm AM-QS chứa hỗn hợp 3 đơn chất này. Ở dạng đơn chất, preventol (1 mg/l) ức chế 90% đường kính nấm và ức chế hoàn toàn sự sinh trưởng của các chủng nấm ở nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) là 5 mg/l. Đối với α -BCA, đường kính khuẩn lạc nấm giảm 93,5% ở nồng độ 10 mg/l và giá trị MIC được xác định là 20 mg/l. Với đồng sunfat, đường kính khuẩn lạc nấm giảm 94,9% ở 10 mg/l và MIC là 20 mg/l. Ở dạng kết hợp, chế phẩm AM-QS ức chế hoàn toàn sự sinh trưởng của các chủng nấm ở nồng độ 2%, tương đương 0,1 mg/l (preventol), 0,4 mg/l (α -BCA) và 0,4 mg/l (đồng sunfat). Như vậy, hiệu quả hiệp đồng kháng nấm của chế phẩm AM-QS với nồng độ mỗi chất sử dụng giảm 50 lần so với khi thử nghiệm với từng đơn chất. Việc ứng dụng kết hợp các đơn chất kháng nấm có thể giúp tăng cường hiệu quả bảo vệ vật dụng bằng gỗ hay những vật liệu có nguồn gốc từ gỗ.

Từ khóa: α -bromo-cinnamaldehyde, đồng sunfat, hiệu quả hiệp đồng, kháng nấm, preventol.

Chỉ số phân loại: 4.6

1. Đặt vấn đề

Trong thực tế, nấm mốc dễ xâm nhiễm trên gỗ hay các vật liệu có nguồn gốc cellulose (giấy, sách báo...) [1] gây mục nát, hư hỏng, giảm tuổi thọ và mất giá trị thẩm mỹ của công trình và các hiện vật trưng bày. Nhiều nấm mốc được tìm thấy thuộc các chi như *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Penicillium* và *Trichoderma* [2]. Một số enzyme sinh ra trong quá trình trao đổi chất như amylase, cellulase, protease, laccase giúp nấm mốc sinh trưởng trên vật liệu gỗ, trong đó cellulase là một trong những enzyme chính phân hủy cellulose tạo nguồn carbon cho nấm [3].

Các giải pháp nhằm bảo quản các vật dụng bằng gỗ dựa trên phương pháp vật lý và hóa học đã được ứng dụng. Tuy nhiên, các hoạt chất hóa học và các chế phẩm của chúng được sử dụng phổ biến hơn vì vừa có hiệu quả cao, vừa dễ thực hiện. Các nhóm hóa chất được sử dụng như: phenol, aldehyde, isothiazolinones và alcohol. Preventol là một hợp chất hữu cơ, dạng rắn, màu trắng là dẫn xuất của phenol có chức năng diệt nấm và bào tử của nấm thuộc chi *Penicillium*, *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Curvularia*... Cơ chế hoạt động kháng nấm của preventol bằng cách thâm nhập qua màng tế bào chất của nấm nhờ liên kết với thành phần ergosterol của màng tế bào, tạo thành lỗ nhỏ trên màng nhằm dẫn các chất trong nội bào ra ngoài, tích tụ nội bào ở nồng độ cao của hóa chất sử dụng và gây phá hủy màng

[4]. Hoạt chất α -BCA là một trong những dẫn xuất halogen của cinnamaldehyde, thành phần chính trong tinh dầu quế có hoạt tính kháng nấm mốc phổ rộng, ít gây độc cho người sử dụng. Chất α -BCA được báo cáo không chỉ ức chế các loại nấm mốc như *Candida albicans*, *Aspergillus niger* và *Penicillium chrysogenum*, mà còn ức chế được nhiều loại vi khuẩn như *Bacillus subtilis*, *Sarcia lutea*, *Staphylococcus aureus* [5, 6]. Cơ chế hoạt động kháng nấm của α -BCA nhờ vào khả năng thâm nhập qua màng tế bào và bề mặt bào tử, phản ứng với cả amino acid của phân tử protein và nhóm purine và pyrimidine của phân tử ADN, ARN [7, 8]. Hợp chất đồng sunfat hút ẩm, được sử dụng như thuốc kháng nấm hoặc diệt các loại sâu bệnh, diệt cỏ. Hoạt động ức chế sự hình thành nấm mốc của đồng sunfat thông qua tác động ức chế quá trình hô hấp của tế bào hay quá trình đường phân [9]. Mặc dù đồng sunfat ít được sử dụng dạng đơn chất để bảo quản gỗ do dễ bị rửa trôi, có thể làm mất màu gỗ, song rất có hiệu quả trong các ứng dụng khi được kết hợp với các hợp chất đối kháng khác có tính cố định (ít bị rửa trôi) [10].

Hiện nay, thuốc hoặc các phân tử thể hiện tính hiệp đồng khi kết hợp với nhau, nghĩa là làm tăng cường một hoặc nhiều tác dụng của những loại thuốc đó hay tạo ra một hiệu ứng mới mà chỉ riêng nó không tạo ra được [5]. Chiến lược phát triển thuốc kết hợp được ứng dụng rộng rãi để điều trị bệnh với mục tiêu đạt được hiệu quả điều trị hiệp đồng,

*Tác giả liên hệ: Email: cuongnc@vrtc.org.vn, ngocaocong2011@gmail.com

Synergistic antifungal effect of preventol, α -bromo-cinnamaldehyde, and copper sulfate compounds against wood harmful fungi

Vu Hung Nguyen¹, Khanh Linh Tran^{2,3},
Thi Thanh Loi Nguyen^{3,4}, Trong Tai Le⁵, Cao Cuong Ngo^{2*}

¹31 Electro Mechanism and Explosive One Member Company Limited,
Bai Bong Ward, Pho Yen City, Thai Nguyen Province, Vietnam

²Joint Vietnamese - Russia Tropical Science and Technology Research Center,
63 Nguyen Van Huyen Street, Nghia Do Ward, Cau Giay District, Hanoi, Vietnam

³Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology,
18 Hoang Quoc Viet Street, Nghia Do Ward, Cau Giay District, Hanoi, Vietnam

⁴Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology,
18 Hoang Quoc Viet Street, Nghia Do Ward, Cau Giay District, Hanoi, Vietnam

⁵State Agency for Technology and Innovation, Vietnam Ministry of Science and Technology,
113 Tran Duy Hung Street, Trung Hoa Ward, Cau Giay District, Hanoi, Vietnam

Received 8 December 2023; revised 29 December 2023; accepted 4 January 2024

Abstract:

The objective of the study is to evaluate the antifungal ability against wood harmful fungi (*in vitro*), of three active compounds: preventol, α -bromo-cinnamaldehyde (α -BCA), copper sulfate, and to evaluate the synergistic effect of a formulation AM-QS containing a mixture of these 3 compounds. As a single substance, preventol (1 mg/l) inhibited 90% of the fungal diameter and reached complete inhibition of the growth of fungal strains at the minimum inhibitory concentration (MIC) of 5 mg/l. For α -BCA, the fungal colony diameter decreased by 93.5% at a concentration of 10 mg/l, and the MIC value was determined to be 20 mg/l. With copper sulfate, colony diameter was reduced by 94.9% at 10 mg/l and the MIC was 20 mg/l. In combination form, the AM-QS completely inhibited the growth of fungal strains at concentrations of 2% equivalent to 0.1 mg/l (preventol), 0.4 mg/l (α -BCA), and 0.4 mg/l (copper sulfate). Thus, the synergistic antifungal effect of AM-QS preparation with the concentration of each substance used is reduced by 50 times compared to when tested with every single substance. Applying a combination of single antifungal substances could help to increase the effectiveness of protecting wooden objects or materials derived from wood.

Keywords: α -bromo-cinnamaldehyde, antifungal, copper sulfate, preventol, synergistic effect.

Classification number: 4.6

giảm liều lượng và độc tính, giảm thiểu hoặc trì hoãn việc gây kháng thuốc [11]. Hiệu quả kháng nấm của hỗn hợp chất kháng nấm đã chỉ ra: tác dụng chống nấm mốc của các hóa chất được tăng cường và có hiệu quả cao hơn khi sử dụng riêng lẻ bởi không có hóa chất nào có thể phòng chống được tất cả các loại nấm mốc, giảm được nồng độ của các chất sử dụng so với đơn chất riêng lẻ. Điều này sẽ hạn chế dư lượng của hóa chất tồn tại trong môi trường đồng thời nâng cao hiệu quả sử dụng trong phòng chống nhiều loại nấm khác nhau [12].

Đối với gốc aldehyde, nghiên cứu về sự kết hợp giữa cinnamaldehyde và các chất kháng vi sinh vật khác đã chỉ ra khả năng chống lại cả các chủng nấm kháng và không kháng thuốc, chẳng hạn như sự kết hợp giữa cinnamaldehyde và fluconazole hoặc AmB (Amphotericin B) [13]. Các công thức hỗn hợp chất có thể chứa các thành phần chất có nguồn gốc tự nhiên và các hợp chất tổng hợp. L. Cai và cs (2020) [14] đã chỉ ra công thức hỗn hợp của chitosan và cinnamaldehyde ở các tỷ lệ mol khác nhau đã ức chế sự sinh trưởng nấm *A. niger* khác nhau từ 16,7% (ở tỷ lệ 0,5:1) đến 95,8% (ở tỷ lệ 3:1).

Việc đánh giá hiệu quả hiệp đồng kháng các loài nấm mốc gây hại chính của các chất kháng nấm khác nhau sẽ là cơ sở khoa học cho việc tạo ra những công thức hỗn hợp chất phòng trừ nấm hiệu quả và hạn chế những ảnh hưởng do dư thừa hóa chất được sử dụng. Trong nghiên cứu này, thử nghiệm khả năng ức chế các chủng nấm sợi gây hại gỗ với từng đơn hoạt chất preventol, α -BCA và đồng sunfat và đánh giá hiệu quả hiệp đồng kháng nấm của chế phẩm AM-QS được kết hợp từ 3 hoạt chất trên với tỷ lệ thành phần được dựa vào giá trị ức chế tối thiểu của mỗi đơn chất ban đầu.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên, vật liệu

Preventol, α -BCA và đồng sunfat dạng tinh thể (Sigma-Aldrich, Thermo scientific độ tinh khiết trên 98%). Chế phẩm AM-QS được tạo thành dưới dạng dung dịch chứa thành phần 3 đơn chất (preventol, α -BCA và đồng sunfat), sao cho mỗi đơn chất đạt ngưỡng ức chế tối thiểu. Các chủng nấm chiếm ưu thế về số lượng phân lập trong các mẫu thu thập từ 3 miền Bắc - Trung - Nam (thuộc K602 - Thái Nguyên, K856 - Quảng Trị và K752 - Đồng Nai) được định danh và đăng ký mã số trên GenBank sử dụng trong các nghiên cứu. Môi trường Czapek-Dox dùng cho nuôi cấy và thử nghiệm ức chế nấm [15].

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đặc điểm sinh học của các chủng nấm

Cấy từng chủng nấm đã thuần khiết trên đĩa thạch chứa môi trường Czapek-Dox, cắm lamên nghiêng, đặt đĩa thạch trong tủ nuôi ở nhiệt độ 28-30°C. Sau 72-120 giờ, lamên được lấy ra nhuộm màu và quan sát hình thái cuống sinh bào tử và bào tử dưới kính hiển vi quang học [16].

2.2.2. Xác định hoạt tính enzyme ngoại bào của các chủng nấm

Hoạt tính enzyme ngoại bào amylase, cellulase và laccase của các chủng nấm được xác định bằng phương pháp nuôi cấy nấm trên đĩa thạch Czapek-Dox chứa cơ chất tương ứng. Đặt miếng thạch nấm có đường kính 6 mm lên đĩa thạch Czapek-Dox được bổ sung cơ chất tương ứng 0,5% tinh bột, 1% CMC (Carboxymethyl cellulose), 0,05% Guaiacol. Đặt các đĩa nuôi cấy nấm vào tủ ẩm 30°C trong 24 giờ. Các chủng nấm thể hiện hoạt tính enzyme sẽ xuất hiện vòng sáng xung quanh khuẩn lạc sau khi hiện màu bằng dung dịch Lugol 1% [17]. Đo đường kính vòng phân giải (mm) trên đĩa thạch.

2.2.3. Đánh giá khả năng kháng nấm của các hợp chất thử nghiệm

Chuẩn bị dung dịch gốc ban đầu preventol, α -BCA và đồng sunfat ở nồng độ 500 mg/l. Bổ sung từng dung dịch chất thử nghiệm vào môi trường Czapek-Dox sao cho nồng độ chất preventol trong thạch đạt 0,5, 1, 5, 10 và 25 mg/l; chất α -BCA trong thạch 1, 5, 10, 20 và 50 mg/l; đồng sunfat trong thạch 2, 4, 6, 8, 10 và 20 mg/l. Đặt miếng thạch nấm thử nghiệm đường kính 6 mm ở tâm đĩa môi trường đã bổ sung chất kháng nấm. Nuôi cấy ở điều kiện 28±2°C trong 5 ngày. Kết quả kháng nấm được đánh giá bằng cách đo đường kính (mm) khuẩn lạc nấm sợi phát triển trên đĩa thạch. Mẫu đối chứng được tiến hành tương tự, môi trường không bổ sung chất kháng nấm. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần [18, 19].

2.2.4. Đánh giá khả năng kháng nấm của hỗn hợp chất thử nghiệm AM-QS

Chế phẩm AM-QS chứa 3 đơn chất preventol, α -BCA và đồng sunfat ở nồng độ ức chế hoàn toàn sự phát triển của nấm sợi (từ kết quả thử nghiệm đơn chất). Tiến hành thử nghiệm AM-QS tương tự như với đơn chất, bổ sung AM-QS vào môi trường thạch với tỷ lệ 0,1, 0,5, 1, 2 và 5%. Đặt miếng thạch nấm thử nghiệm đường kính 6 mm ở tâm đĩa môi trường đã bổ sung chế phẩm kháng nấm. Nuôi cấy ở điều kiện 28±2°C trong 5 ngày. Kết quả kháng nấm được đánh giá bằng cách đo đường kính (mm) khuẩn lạc nấm sợi phát triển trên đĩa thạch. Mẫu đối chứng được tiến hành tương tự trong môi trường không bổ sung chất kháng nấm. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần [18, 19].

2.3. Xử lý số liệu

Các thí nghiệm được thực hiện lặp lại 3 lần. Kết quả được tính toán bằng phần mềm Excel 2010 và trình bày dưới dạng giá trị trung bình ± sai số chuẩn.

3. Kết quả và bàn luận

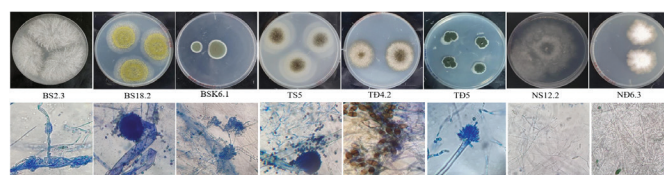
3.1. Đặc điểm các chủng nấm dùng trong thử nghiệm

Từ bộ sưu tập chủng nấm được phân lập trên bề mặt vật liệu gỗ từ 3 kho K603, K752 và kho K890 đã chọn được 8 chủng nấm gây hại điển hình có khả năng sinh các enzyme ngoại bào (amylase, cellulase và laccase) hoạt tính mạnh

nhất, có các đặc điểm sinh học được mô tả trong bảng 1 và hình 1. Các chủng nấm được định danh bằng phương pháp sinh học phân tử, thuộc các chi *Aspergillus* (4 chủng: *A. flavus* BS18.2, *A. gracilis* BSK6.1, *A. niger* TS5, *A. sydowii* TD5), chi *Paraeutypella* (1 chủng *P. citricola* BS2.3), chi *Curvularia* (1 chủng *C. eragrostidis* TD4.2), *Pestalotiopsis* (1 chủng *P. vismiae* NS12.2) và chi *Camarosporium* (1 chủng *C. brabeji* ND6.3).

Bảng 1. Đặc điểm sinh học của 8 chủng nấm được sử dụng trong nghiên cứu.

Chủng nấm và các đặc điểm sinh học	Hoạt tính enzyme (mm)		
	Amylase	Cellulase	Laccase
<i>Paraeutypella citricola</i> BS2.3 (OR135779): Khuẩn lạc tỏa tròn, màu trắng, bề mặt bông xốp, tơi xốp. Không có giọt tiết, không sinh sắc tố. Bào tử trần, đa bào có vách ngăn, hình trứng/hình thoi.	16±1,34	22±1,67	26±1,72
<i>Aspergillus flavus</i> BS18.2 (OR135780): Khuẩn lạc tỏa tròn, màu vàng rêu, viền trắng và thưa, bề mặt dạng bột, xốp nhẹ. Không có giọt tiết, không sinh sắc tố. Cuống sinh bào tử trần, không màu, không phân nhánh, đỉnh phình to thành bong bóng cầu hoặc elip, bề mặt đều các thể bình 1, 2 tầng. Bào tử hình cầu hoặc trứng, dạng trần.	10±0,95	18±0,78	16±0,59
<i>Aspergillus gracilis</i> BSK6.1 (OR135781): Khuẩn lạc tỏa tròn, vùng xanh lục xám, bột mịn. Không có giọt tiết, không tạo sắc tố. Cuống sinh bào tử trần, phân nhánh, đỉnh có bong bóng nhỏ, đỉnh chùy thể bình dạng ngắn đều hướng lên song song dạng chổi. Bào tử tròn, dạng trần.	29±0,92	24±1,0	32±1,04
<i>Aspergillus niger</i> TS5 (OR135784): Khuẩn lạc có hệ sợi trắng dày mịn, bề mặt xốp bông, lấm tấm bào tử màu đen than. Không có giọt tiết, không sinh sắc tố. Cuống sinh bào tử không phân vách, trần, nhẵn, đầu cuống có bong bóng phình to, đỉnh nhiều thể bình 2 tầng. Bào tử hình cầu, trần, đỉnh từng chùm.	7±0,87	20±0,98	16±1,30
<i>Curvularia eragrostidis</i> TD4.2 (OR135782): Khuẩn lạc phân vùng, từ màu đen xám đậm đến màu ghi trắng, bề mặt bông, xốp. Không có giọt tiết, không sinh sắc tố. Giả bào tử dạng trần, đơn, màu đỏ nâu. Bào tử áo dạng đơn, trần, 3 vách ngăn, ở đỉnh sợi, hình elip hoặc trứng.	11±1,23	16±1,45	19±1,10
<i>Aspergillus sydowii</i> TD5 (OR135783): Khuẩn lạc dạng tỏa tròn, màu lục rêu, viền trắng mịn, bề mặt dạng bột mịn hoặc xốp nhẹ. Không có giọt tiết, sinh sắc tố xanh. Cuống sinh bào tử không phân vách, trần, nhẵn, không màu, đầu cuống có bong bóng phình to. Bào tử hình cầu, trần, đỉnh từng chùm dày trên mỗi thể bình.	17±0,89	15±1,04	20±0,97
<i>Pestalotiopsis vismiae</i> NS12.2 (OR135786): Khuẩn lạc dạng tỏa tròn, màu trắng, bông mịn dạng len và hơi thưa mỏng ở tâm. Không có giọt tiết, không sinh sắc tố.	1±0,78	13±0,88	18±1,35
<i>Camarosporium brabeji</i> ND6.3 (OR135785): Khuẩn lạc trắng ở tâm, vàng nâu ở viền ngoài. Có các rãnh kéo từ tâm đến biên. Khuẩn lạc mọc tỏa các phía, không tròn đều. Mặt khuẩn lạc dạng bông mịn, xốp nhẹ, lồi ở tâm. Không có giọt tiết, không sinh sắc tố.	10±0,69	13±1,56	18±1,63



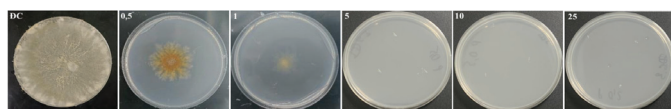
Hình 1. Hình thái khuẩn lạc (hình trên) và bào tử (hình dưới) của 8 chủng nấm phân lập thuần khiết từ vật liệu gỗ được sử dụng trong nghiên cứu.

3.2. Khả năng kháng nấm của preventol, α -BCA và đồng sunfat (in vitro)

Hoạt chất ức chế nấm preventol khi được thử nghiệm ở 5 nồng độ khác nhau từ 0,5, 1, 5, 10 đến 25 mg/l trên 8 chủng nấm gây hại vật liệu cellulose mạnh cho thấy sự ức chế sinh trưởng nấm. Sau 5 ngày sinh trưởng, các chủng nấm đều phát triển tốt ở mẫu đối chứng với đường kính khuẩn lạc khoảng 85-91 mm. Ở nồng độ thử nghiệm 0,5 mg/l, các chủng nấm đều có hiện tượng giảm rõ rệt đường kính khuẩn lạc dao động trong khoảng 21-25 mm. Khi tăng nồng độ lên 1 mg/l, nấm phát triển rất chậm, đường kính khuẩn lạc trung bình của các chủng nấm giảm trong khoảng 6,6-12,4 mm (giảm 90%). Từ 5 mg/l trở lên đã không ghi nhận sự hình thành khuẩn lạc của cả 8 chủng nấm thử nghiệm. Như vậy, tại nồng độ tối thiểu (MIC 5 mg/l), preventol đã ức chế hoàn toàn sự phát triển của cả 8 chủng nấm gây hại (bảng 2). Minh họa thử nghiệm của preventol trên chủng nấm gây hại *Camarosporium brabeji* ND6.3 ở hình 2.

Bảng 2. Khả năng kháng nấm của preventol ở nồng độ 0,5, 1, 5, 10 và 25 mg/l.

Các chủng nấm	Đường kính khuẩn lạc nấm ở các nồng độ (mm)					
	Đối chứng	0,5	1	5	10	25
<i>Paraeutypella citricola</i> BS2.2	91,7±0,46	21,4±0,51	8,4±0,53	0	0	0
<i>Aspergillus flavus</i> BS18.2	90,3±0,29	23,7±0,87	9,6±0,55	0	0	0
<i>Aspergillus gracilis</i> BSK6.1	89,5±0,50	22,9±0,45	6,6±0,81	0	0	0
<i>Aspergillus niger</i> TS5	90,9±0,85	25,7±0,87	12,4±0,55	0	0	0
<i>Curvularia eragrostidis</i> TD4.2	87,6±0,53	21,1±1,05	6,6±1,07	0	0	0
<i>Aspergillus sydowii</i> TD5	85,5±0,50	22,3±0,70	8,4±0,69	0	0	0
<i>Pestalotiopsis vismiae</i> NS12.2	88,1±0,90	24,1±1,01	8,5±0,47	0	0	0
<i>Camarosporium brabeji</i> ND6.3	85±0,82	23,9±1,03	9,6±0,40	0	0	0



Hình 2. Thử nghiệm khả năng kháng nấm của preventol ở chủng *Camarosporium brabeji* ND6.3 với các nồng độ 0,5, 1, 5, 10 và 25 mg/l.

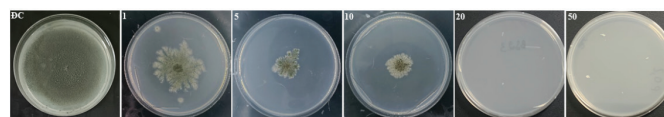
Nghiên cứu của J.W. Eckert và cs (1979) [20] đã chỉ ra độc tính mạnh của o-phenylphenol và các dẫn xuất của nó lên chủng nấm *Diplodia natalensis* và *Penicillium digitatum*. Sự thủy phân 2 dẫn xuất este, 2-biphenyl acetate và 2-biphenyl propionate, trong dịch nuôi cấy 2 chủng nấm trên dẫn đến sự tích lũy o-phenylphenol trong môi trường nuôi cấy và trên sợi nấm gây độc cho nấm. Công bố của H.N. Tumah (2005) [21] đã chỉ ra, 2-phenylphenol 1% có khả năng diệt một số chủng nấm sau 15 phút tiếp xúc với hoạt chất ở nồng độ 7 μ g/ml đối với chủng *C. albicans*, 15 μ g/ml với chủng *A. versicolor* và *A. corymbifera* và 30 μ g/ml với chủng *P. verrucosum* var. *cyclopium*.

Đối với chất kháng nấm α -BCA, trong dải nồng độ được thử nghiệm từ 1, 5, 10, 20 đến 50 mg/l, ở mẫu đối chứng cả 8 chủng nấm đều phát triển mạnh và đạt kích thước khuẩn lạc khoảng 83-93 mm sau 5 ngày thử nghiệm. Khi các nồng độ

chất ức chế tăng dần 1-10 mg/l, ghi nhận kích thước khuẩn lạc trung bình giảm dần tương ứng 31,8 mm xuống còn 5,7 mm (giảm 93,5%). Từ nồng độ 20 mg/l không thấy sự hình thành khuẩn lạc nấm trên đĩa thạch trong thời gian nuôi cấy (bảng 3). Như vậy tại MIC 20 mg/l, hoạt chất kháng nấm α -BCA đã ức chế hoàn toàn sự phát triển của cả 8 chủng nấm gây hại. Minh họa thử nghiệm của α -BCA trên chủng nấm gây hại *Aspergillus sydowii* TD5 được thể hiện ở hình 3.

Bảng 3. Khả năng kháng nấm của α -BCA ở các nồng độ 1, 5, 10, 20 và 50 mg/l.

Các chủng nấm	Đường kính khuẩn lạc nấm ở các nồng độ (mm)					
	Đối chứng	1	5	10	20	50
<i>Paraeutypella citricola</i> BS2.2	93,2±0,76	32,1±1,05	21,1±1,01	5±0,8	0	0
<i>Aspergillus flavus</i> BS18.2	92,1±0,90	29,7±1,22	24,3±1,04	5,2±1,04	0	0
<i>Aspergillus gracilis</i> BSK6.1	86,4±0,71	30,1±1,10	22,8±0,91	5,7±0,64	0	0
<i>Aspergillus niger</i> TS5	92,8±0,76	34,9±0,83	25,7±0,64	8,1±0,97	0	0
<i>Curvularia eragrostidis</i> TD4.2	87±1,50	31,8±0,80	17±1,00	5,8±0,72	0	0
<i>Aspergillus sydowii</i> TD5	86,3±0,79	33±0,90	22,4±1,42	5±0,75	0	0
<i>Pestalotiopsis vismiae</i> NS12.2	84,4±1,12	32,1±0,90	19,4±0,49	5,7±0,64	0	0
<i>Camarosporium brabeji</i> ND6.3	82,9±0,81	30,8±1,04	18,2±1,15	4,7±0,51	0	0



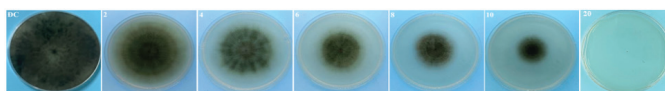
Hình 3. Thử nghiệm khả năng kháng nấm của α -BCA trên chủng *Aspergillus sydowii* TD5 ở nồng độ 1, 5, 10, 20 và 50 mg/l.

Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra khả năng kháng nấm mạnh của cinnamaldehyde [22-24]. Z. Gan và cs (2020) [22] đã chỉ ra tiềm năng kháng nấm bệnh *P. digitatum* của cinnamaldehyde và 6 chất dẫn xuất của nó thông qua sự có mặt của vòng kháng nấm. Trong đó, dẫn xuất 4-methoxy cinnamaldehyde có hoạt tính kháng nấm cao nhất với đường kính 32,3±0,35 mm, tiếp theo là cinnamaldehyde (31,4±0,57 mm), 2,4-dimethoxy cinnamaldehyde (29,4±0,57 mm), 4-methyl cinnamaldehyde (21,4±0,7 mm), 4-chloro cinnamaldehyde (20,5±0,71 mm), 4-bromo cinnamaldehyde (17,5±0,71 mm), and 4-nitro cinnamaldehyde (16,8±0,29 mm).

Khả năng ức chế các chủng nấm của đồng sunfat được thực hiện với 6 nồng độ từ 2, 4, 6, 8, 10 và 20 mg/l. Ở mẫu đối chứng cả 8 chủng nấm đều phát triển mạnh và đạt kích thước khuẩn lạc khoảng 86-93 mm sau 5 ngày thử nghiệm. Khi nồng độ đồng sunfat tăng lên từ 2, 4, 6, 8 và 10 mg/l, chất ức chế đã tác động lên sự sinh trưởng của sợi nấm làm giảm đường kính trung bình khuẩn lạc nấm xuống còn 4,5 mm (10 mg/l) tương ứng 94,9%. Tại nồng độ được thử nghiệm cao nhất 20 mg/l đã ức chế hoàn toàn sự sinh trưởng của nấm (bảng 4). Như vậy tại dải nồng độ thử nghiệm, đồng sunfat đã ức chế hoàn toàn sinh trưởng của 8 chủng nấm mốc ở nồng độ 20 mg/l. Minh họa thử nghiệm của đồng sunfat trên chủng nấm gây hại *Curvularia eragrostidis* TD4.2 được thể hiện ở hình 4.

Bảng 4. Khả năng kháng nấm của đồng sunfat ở nồng độ 2, 4, 6, 8, 10 và 20 mg/l.

Các chủng nấm	Đường kính khuẩn lạc nấm ở các nồng độ (mm)						
	Đối chứng	2	4	6	8	10	20
<i>Paratythella citricola</i> BS2.2	89,9±1,91	62,4±1,34	52,2±0,92	35,4±0,35	22,6±1,77	3,8±0,21	0
<i>Aspergillus flavus</i> BS18.2	92,2±1,85	61,7±2,21	57,4±0,51	24,1±1,01	21,5±0,5	3,5±0,5	0
<i>Aspergillus gracilis</i> BSK6.1	86,8±0,59	60,3±0,79	51,6±2,35	36,3±0,38	24,3±0,64	5,3±0,7	0
<i>Aspergillus niger</i> TS5	92,6±0,71	70,7±1,54	54,7±1,1	36,7±0,7	24,9±1,01	6,1±1,05	0
<i>Curvularia eragrostidis</i> TD4.2	86,2±1,04	62,6±1,42	51,5±1,55	32,5±0,5	18,6±0,55	4,4±0,55	0
<i>Aspergillus sydowii</i> TD5	88,8±1,08	60,1±0,81	47±1,05	35,4±0,55	23,5±0,5	4±0,56	0
<i>Pestalotiopsis vismiae</i> NS12.2	88,6±2,23	62,2±0,21	53,4±0,71	33±0,55	22±1,00	4,4±0,31	0
<i>Camarosporium brabeji</i> ND6.3	85,9±0,42	64,1±0,46	52,1±0,81	32,5±1,32	24,5±0,70	4,1±0,42	0



Hình 4. Thử nghiệm khả năng kháng nấm của đồng sunfat ở chủng *Curvularia eragrostidis* TD4.2 với các nồng độ 2, 4, 6, 8, 10 và 20 mg/l.

Nghiên cứu của E.O. Oziengbe và cs (2012) [9] đã chỉ ra khả năng ức chế nấm bệnh thân thư trên cây xoài của đồng sunfat. Dưới điều kiện *in vitro*, chủng nấm bệnh *Colletotrichum gloeosporioides* bị ức chế sinh trưởng đáng kể đến 78,2% và sự nảy mầm của bào tử nấm 66,3% so với đối chứng, ở nồng độ 0,8 mg/l đồng sunfat. Với xu hướng sử dụng công nghệ nano, tác giả E.I. Laclette và cs (2022) [18] đã chỉ ra rằng, nano đồng (Cu-NP) có khả năng ức chế nấm sợi gây bệnh cho thực vật *Fusarium kuroshium*. Cu-NP ở các nồng độ khác nhau đã ức chế hơn 80% sự phát triển của *F. kuroshium* và thậm chí còn hiệu quả hơn so với thuốc diệt nấm thương mại.

3.3. Khả năng ức chế nấm gây hại gỗ của chế phẩm AM-QS (*in vitro*)

Căn cứ vào kết quả kháng nấm của từng đơn chất (giá trị MIC), chế phẩm AM-QS chứa 3 chất gồm preventol, α -BCA và đồng sunfat được thử nghiệm ở 5 nồng độ khác nhau từ 0,1, 0,5, 1, 2 và 5%, tương ứng với nồng độ (mg/l) của mỗi thành phần đơn chất được quy đổi ở bảng 5. Kết quả đối kháng nấm của hỗn hợp chất AM-QS chỉ ra, ở nồng độ 0,1% sự sinh trưởng của nấm bắt đầu bị ức chế, đường kính khuẩn lạc nấm chỉ đạt 18-24,7 mm. Khi tăng lên nồng độ 1%, đường kính khuẩn lạc nấm giảm xuống mức thấp nhất khoảng 2,1-4,4 mm (tương ứng 96,6%). Từ nồng độ 2% và cao hơn, nấm bị ức chế hoàn toàn, không hình thành khuẩn lạc trên đĩa thạch (bảng 6 và hình 5), trong khi các chủng nấm ở mẫu đối chứng phát triển bình thường với đường kính khuẩn lạc đạt 85,8-90,8 mm sau 5 ngày nuôi cấy. Minh họa thử nghiệm của chế phẩm AM-QS trên chủng nấm gây hại *Pestalotiopsis vismiae* NS12.2 ở hình 5. Như vậy, ở nồng độ 2% của AM-QS tương đương nồng độ của từng đơn chất là 0,1 mg/l preventol, 0,4 mg/l α -BCA và 0,4 mg/l đồng sunfat, các chủng nấm bị ức chế sinh trưởng hoàn toàn. Như vậy, so với khi sử dụng từng đơn chất, nồng độ thực tế của mỗi đơn chất trong hỗn hợp đã giảm 50 lần. Hiệu quả

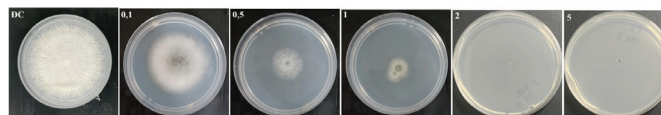
hiệp đồng ức chế của các đơn chất trong chế phẩm AM-QS được thể hiện một cách rõ rệt so với sử dụng từng đơn chất.

Bảng 5. Giá trị nồng độ mg/l của mỗi đơn chất trong chế phẩm AM-QS.

AM-QS (mg/l)	AM-QS (%)				
	0,1	0,5	1	2	5
Preventol	0,005	0,025	0,050	0,100	0,25
α -BCA	0,020	0,100	0,200	0,400	1,00
Đồng sunfat	0,020	0,100	0,200	0,400	1,00

Bảng 6. Khả năng kháng nấm của AM-QS ở các nồng độ 0,1, 0,5, 1, 2 và 5%.

Các chủng nấm	Đường kính khuẩn lạc nấm ở các nồng độ (mm)					
	Đối chứng	0,1	0,5	1	2	5
<i>Paratyphella citricola</i> BS2.2	90,8±0,68	20,8±0,57	11,9±0,99	2,5±0,55	0,00	0,00
<i>Aspergillus flavus</i> BS18.2	89,8±0,97	21,7±0,75	13,8±0,86	2,6±0,74	0,00	0,00
<i>Aspergillus gracilis</i> BSK6.1	88,7±0,70	21,7±0,65	10,2±0,80	3,4±0,35	0,00	0,00
<i>Aspergillus niger</i> TS5	90,8±0,76	24,7±0,64	13±0,80	4,4±0,59	0,00	0,00
<i>Curvularia eragrostidis</i> TD4.2	86,4±1,31	18±1,10	8,2±0,25	4,2±0,76	0,00	0,00
<i>Aspergillus sydowii</i> TD5	85,8±0,76	21,1±0,85	9,7±0,61	2,3±0,35	0,00	0,00
<i>Pestalotiopsis vismiae</i> NS12.2	86,6±1,25	18,2±0,40	7,6±0,60	2,6±0,53	0,00	0,00
<i>Camarosporium brabeji</i> ND6.3	87,1±1,10	20,9±1,21	7,8±0,76	2,1±0,15	0,00	0,00

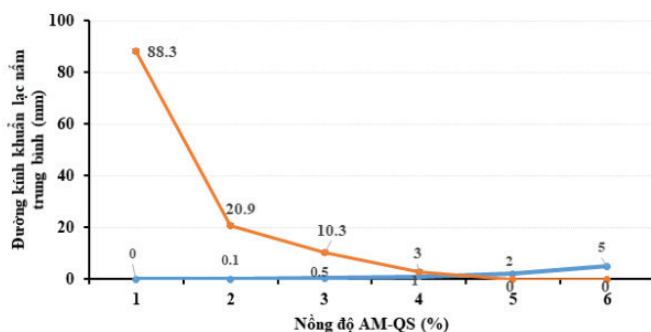


Hình 5. Hình ảnh thử nghiệm khả năng kháng nấm của AM-QS với chủng *Pestalotiopsis vismiae* NS12.2 ở các nồng độ 0,1, 0,5, 1, 2 và 5%.

Công bố của H.N. Tumah (2005) [21] đã chỉ ra, sự kết hợp giữa Triclosan 0,5% với 2-phenylphenol 0,5% đã làm tăng hiệu quả hiệp đồng của 2 hoạt chất lên 3 chủng nấm *C. albicans*, *A. versicolor* và *A. corymbifera* chỉ ở nồng độ 1,5 μ g/ml hỗn hợp và với *P. verrucosum* var. *cyclopium* chỉ ở nồng độ 3 μ g/ml. Hiệu quả hiệp đồng của 2 chất đã làm tăng khả năng diệt nấm lên khoảng 5-10 lần đồng thời giảm nồng độ của mỗi hoạt chất sử dụng. Điều này có thể làm giảm thiểu tác dụng phụ có thể có của 2 hoạt chất. Nghiên cứu khác của L. Cai và cs (2020) [14] về công thức kháng nấm *Postia placenta*, *Gloeophyllum trabeum* gây hại trên gỗ thông, chứa hỗn hợp methyl- β -cyclodextrin và cinnamaldehyde đã cho thấy hiệu quả đáng kể dựa vào sự kết hợp của các hoạt chất. Khối lượng gỗ bị mất đi sau xử lý với hỗn hợp cinnamaldehyde và 50% dung dịch methyl- β -cyclodextrin chỉ là 5,5% với nấm gây hại *P. placenta* và chỉ 6,86% do nấm gây hại *G. trabeum* so với đối chứng khoảng 35%. Hỗn hợp chất của Nano-CuO và dịch chiết lá *Nerium oleander* có khả năng ức chế nấm *Trametes hirsuta*, *Postia placenta* gây hại trên gỗ cao su (*Hevea brasiliensis*). Khối lượng gỗ bị mất đi sau xử lý với công thức hỗn hợp chất là 24,75% do nấm gây hại *T. hirsuta* so với gỗ không được xử lý 28,28%, và mất đi 13,19% do nấm gây hại *P. placenta* so với gỗ không được xử lý 51,59% [25].

Nhằm quan sát tổng thể khả năng ức chế nấm gây hại cellulose mạnh của hỗn hợp 3 đơn chất trên, một đường xu hướng biểu thị giá trị trung bình đường kính khuẩn lạc của

8 chủng nấm thử nghiệm theo nồng độ chế phẩm AM-QS thử nghiệm được xây dựng. Từ đồ thị cho thấy, đường kính trung bình khuẩn lạc nấm có xu thế giảm mạnh, bắt đầu từ 88,3 mm giảm xuống còn 20,9 mm (nồng độ thử nghiệm 0,1%) và tiếp tục giảm đến giá trị 0 mm khi nồng độ chế phẩm AM-QS tăng lên đến 2% (hình 6).



Hình 6. Đường xu hướng biểu diễn kích thước khuẩn lạc nấm theo nồng độ chế phẩm AM-QS từ 0,1, 0,5, 1, 2 đến 5%.

4. Kết luận

Nghiên cứu đã đánh giá khả năng ức chế 8 chủng nấm gây hại gỗ mạnh của 3 đơn hoạt chất preventol, α -BCA và đồng sunfat, đồng thời cũng đánh giá hiệu quả hiệp đồng của một công thức chế phẩm AM-QS kháng nấm chứa hỗn hợp 3 đơn chất trên. Hoạt chất preventol ở nồng độ 1 mg/l ức chế 90% đường kính khuẩn lạc nấm và ức chế hoàn toàn sự sinh trưởng của các chủng nấm ở MIC là 5 mg/l. Đối với α -BCA, đường kính khuẩn lạc nấm giảm 93,5% ở nồng độ 10 mg/l và giá trị MIC là 20 mg/l. Đồng sunfat ức chế sinh trưởng nấm giảm 94,9% ở 10 mg/l và MIC là 20 mg/l. Chế phẩm AM-QS có khả năng ức chế sinh trưởng nấm tăng 50 lần so với dạng đơn chất, trong đó nồng độ ức chế hoàn toàn sự sinh trưởng của các chủng nấm là 2% tương đương 0,1 mg/l (preventol), 0,4 mg/l (α -BCA) và 0,4 mg/l (đồng sunfat).

LỜI CẢM ƠN

Bài báo được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí của Đề tài “Nghiên cứu chế tạo chế phẩm đặc chủng AM-QS chống nấm mốc cho vật liệu gốc xenlulo ứng dụng trong công tác bảo quản vũ khí trang bị” (mã số 2022.11.41) do Bộ Quốc phòng quản lý. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] C.C. Ruiz, R. Avendaño, E.E. Leyva, et al. (2018), "Two new cellulolytic fungal species isolated from a 19th century art collection", *Sci. Rep.*, **8**(1), DOI: 10.1038/s41598-018-24934-7.
- [2] F.E. Bergadi, F. Laachari, S. Elabed, et al. (2013), "Cellulolytic potential and filter paper activity of fungi isolated from ancient manuscripts from the Medina of Fez", *Ann. Microbiol.*, **64**, pp.815-822, DOI: 10.1007/s13213-013-0718-6.
- [3] A.C. Pinheiro, S.O. Sequeira (2020), "Mycological studies in cultural heritage", *Reference Module in Life Sciences*, Elsevier, DOI: 10.1016/B978-0-12-809633-8.21003-0.
- [4] A. Russel (2003), "Similarities and differences in the responses of microorganisms to biocides", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **52**(5), pp.750-763, DOI: 10.1093/jac/dkg422.
- [5] T.C. Chou (2006), "Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies", *Pharmacol. Rev.*, **58**(3), pp.621-681, DOI: 10.1124/pr.58.3.10.

- [6] Y. Akimoto, S. Nito, G. Urakubo (1988), "Studies on the metabolic fate of alpha-bromocinnamaldehyde (an antifungal agent) in rat", *Eisei Kagaku*, **34**(4), pp.303-312, DOI: 10.1248/jhs1956.34.303.
- [7] J.H. Haines, S.A. Kohler (1986), "An evaluation of ortho-phenyl phenol as a fungicidal fumigant for archives and libraries", *Journal of The American Institute for Conservation*, **25**(1), pp.49-55, DOI: 10.2307/3179414.
- [8] T.K. Mazu, B.A. Bricker, H.F. Rozas, et al. (2016), "The mechanistic targets of antifungal agents: An overview", *Mini Rev. Med. Chem.*, **16**(7), pp.555-578, DOI: 10.2174/138955751666616011812103.
- [9] E.O. Oziengbe, J.O. Osazee (2012), "Antifungal activity of copper sulphate against *Colletotrichum Gloeosporioides*", *Journal of Asian Scientific Research*, **2**(12), pp.835-839.
- [10] A. Unger, A. Schniewind, W. Unger (2001), *Conservation of Wood Artifacts: A Handbook*, Springer Berlin, Heidelberg, DOI: 10.1007/978-3-662-06398-9.
- [11] J.H. Kim, N.C. Faria, M.L. Martins, et al. (2012), "Enhancement of antimycotic activity of amphotericin B by targeting the oxidative stress response of *Candida* and *Cryptococcus* with natural dihydroxybenzaldehydes", *Front. Microbiol.*, **3**, DOI: 10.3389/fmicb.2012.00261.
- [12] M. Wóznik (2022), "Antifungal agents in wood protection - A review", *Molecules*, **27**(19), DOI: 10.3390/molecules27196392.
- [13] Z. Bi, S. Fang, Q. Gao, et al. (2021), "Improvement of mould resistance of wood with cinnamaldehyde chitosan emulsion", *Wood Sci. Technol.*, **56**, pp.187-204, DOI: 10.1007/s00226-021-01349-8.
- [14] L. Cai, H. Lim, D.D. Nicholas, et al. (2020), "Bio-based preservative using methyl- β -cyclodextrin essential oil complexes for wood protection", *Int. J. Biol. Macromol.*, **147**, pp.420-427, DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.01.056.
- [15] C.C. Ngo, Q.H. Nguyen, T.H. Nguyen, et al. (2021), "Identification of fungal community associated with deterioration of optical observation instruments of museums in Northern Vietnam", *Appl. Sci.*, **11**(12), DOI: 10.3390/app11125351.
- [16] K.A. Seifert, W. Gams (2011), "The genera of Hyphomycetes - 2011 update", *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, **27**, pp.119-129, DOI: 10.3767/003158511X617435.
- [17] A. Balla, A. Silini, H.C. Silini, et al. (2022), "Screening of cellulolytic bacteria from various ecosystems and their cellulases production under multi-stress conditions", *Catalysts*, **12**(7), DOI: 10.3390/catal12070769.
- [18] E.I. Lacleite, J. Blaz, C.A.P. Torres, et al. (2022), "Antifungal effect of copper nanoparticles against *Fusarium kuroshium*, an obligate symbiont of *Eurwallacea kuroshio* ambrosia beetle", *Fungi (Basel)*, **8**(4), DOI: 10.3390/jof8040347.
- [19] M. Balouiri, M. Sadiki, S.K. Ibensouda (2016), "Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review", *Journal of Pharmaceutical Analysis*, **6**(2), pp.71-79, DOI: 10.1016/j.jpba.2015.11.005.
- [20] J.W. Eckert, O.F. Esuruoso, J. Carey (1979), "Fungitoxicity of derivatives of o-phenylphenol", *The American Phytopathological Society*, **69**(10), pp.1092-1095.
- [21] H.N. Tumah (2005), "Synergistic effect of the combination triclosan with 2-phenylphenol against *Pseudomonas aeruginosa* and fungi", *Saudi Med. J.*, **26**(5), pp.723-727.
- [22] Z. Gan, J. Huang, J. Chen, et al. (2020), "Synthesis and antifungal activities of cinnamaldehyde derivatives against *Penicillium digitatum* causing citrus green mold", *Journal of Food Quality*, **2020**, DOI: 10.1155/2020/8898692.
- [23] T.H. Kang, E.I. Hwang, B.S. Yun, et al. (2007), "Inhibition of chitin synthases and antifungal activities by 2'-benzoyloxycinnamaldehyde from *Pleuropterus ciliinervis* and its derivatives", *Biol. Pharm. Bull.*, **30**(3), pp.598-602, DOI: 10.1248/bpb.30.598.
- [24] K.H. Bang, B.S. Min, Y.H. Lee (1998), "Antifungal activity of cinnamaldehyde derivatives", *The Korean Journal of Mycology*, **26**(4), pp.525-530.
- [25] K.S. Shiny, S. Nair, N. Mamatha, et al. (2022), "Decay resistance of wood treated with copper oxide nanoparticles synthesised using leaf extracts of *Lantana camara* L. and *Nerium oleander* L.", *Wood Material Science & Engineering*, **17**(6), pp.727-733, DOI: 10.1080/17480272.2021.1934728.

Đánh giá khả năng lên men của *Saccharomyces cerevisiae* HG1.3 và điều kiện bảo quản rượu vang trái giác

Đoàn Thị Kiều Tiên¹, Nguyễn Hồ Anh Trung¹, Huỳnh Nguyễn Thúy Quỳnh¹,
Huỳnh Thị Ngọc Mi¹, Nguyễn Ngọc Thạnh², Huỳnh Xuân Phong^{2*}

¹Khoa Công nghệ Sinh học - Công nghệ Hóa học - Công nghệ Thực phẩm, Trường Đại học Kỹ thuật - Công nghệ Cần Thơ,
256 Nguyễn Văn Cừ, phường An Hòa, quận Ninh Kiều, Cần Thơ, Việt Nam

²Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ, đường 3/2, phường Xuân Khánh, quận Ninh Kiều, Cần Thơ, Việt Nam

Ngày nhận bài 15/8/2023; ngày chuyển phản biện 18/8/2023; ngày nhận phản biện 11/9/2023; ngày chấp nhận đăng 14/9/2023

Tóm tắt:

Giác (*Cayratia trifolia* L.) là một trong những loại dây leo mọc hoang, là nguyên liệu có tiềm năng trong lên men rượu vang. Giác có trái màu xanh, khi chín chuyển sang màu tím đậm và được tìm thấy nhiều ở các tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long. Nghiên cứu này nhằm khảo sát hoạt tính lên men trái giác của nấm men *Saccharomyces cerevisiae* HG1.3 ở thể tích 1, 2 và 4 lít. Bên cạnh đó, rượu vang trái giác cũng được thử nghiệm bảo quản ở các điều kiện nhiệt độ và bao bì khác nhau. Kết quả cho thấy, ở thể tích lên men ở 2 và 4 lít có hàm lượng ethanol lần lượt là 12,37 và 12,45% (v/v). Rượu được bảo quản ở nhiệt độ mát (2-4°C) sử dụng chai màu tối có sự ổn định về màu sắc sau 4 tuần, được đánh giá cảm quan tốt về độ trong, màu sắc và mùi vị, giá trị độ truyền quang ở bước sóng 550 nm là 0,419%. Bên cạnh đó, rượu sau lên men còn được bổ sung 0,5% pectinase trong 6 ngày để làm trong, sau đó lọc và thêm 0,2% acid citric, rượu thành phẩm có các chỉ tiêu vi sinh vật và hoá học đạt tiêu chuẩn Việt Nam (TCVN 3217-79 và TCVN 7045:2002).

Từ khóa: *Cayratia trifolia* L., điều kiện bảo quản, rượu vang, *Saccharomyces cerevisiae* HG1.3, trái giác.

Chỉ số phân loại: 4.6

1. Đặt vấn đề

Saccharomyces cerevisiae HG1.3 (*Sac.* HG1.3) là nấm men chịu nhiệt được phân lập từ trái giác, tế bào có hình cầu nhỏ và bào tử hình trứng, có khả năng lên men đường saccharose, maltose và glucose [1]. Chủng nấm men *Sac.* HG1.3 có khả năng lên men rượu vang trái giác ở nhiệt độ 37°C cho hàm lượng ethanol đạt 9,9% (v/v) [1] và 12,0% (v/v) ở điều kiện nhiệt độ 35°C [2, 3]. Sau khi phân lập, *Sac.* HG1.3 được lựa chọn là chủng nấm men chịu nhiệt tiềm năng trong lên men rượu vang trái giác.

Giác mọc hoang và phân bố rộng rãi ở vùng Đồng bằng sông Cửu Long tại các tỉnh Kiên Giang, An Giang, Cà Mau, Hậu Giang... Đây là loại nguyên liệu hoang dại, mọc nhiều trong tự nhiên nên được xem là loại cây có tiềm năng trong sử dụng làm dược liệu cũng như thực phẩm. Với mục tiêu hoàn thiện quy trình lên men rượu vang trái giác, không những rượu được lên men sử dụng các chủng nấm men phân lập từ trái giác mà còn từ các chủng nấm men có hoạt tính lên men tốt khác nhau như *S. cerevisiae* YB3K hay *S. cerevisiae* 2.1 đã được nghiên cứu [4, 5]. Rượu vang trái giác được đánh giá cảm quan tốt với màu tím đặc trưng và đạt các tiêu chuẩn của Bộ Y tế trong sản xuất đồ uống có cồn [1-5]. Ngoài ra, trong rượu vang trái giác còn chứa các hợp chất sinh học như polyphenol hữu ích như không thay đổi sau lên men [2].

*Tác giả liên hệ: Email: hxphong@ctu.edu.vn

Để lên men rượu ở các thể tích khác nhau sẽ cần có các điều kiện lên men phù hợp như thời gian lên men hay lượng chủng nấm men thêm vào để đạt được chất lượng rượu tốt nhất. Bên cạnh đó, quá trình bảo quản rượu cũng là giai đoạn rất quan trọng. Sau khi quá trình lên men kết thúc, rượu vang trái cây cần được lọc để làm trong, ổn định màu sắc cũng như bảo quản ở các điều kiện thích hợp để sản phẩm được tồn trữ lâu hơn, mùi vị và màu sắc được ổn định, qua đó có thể nâng cao được giá trị sản phẩm. Để tiếp tục các nghiên cứu trước đây trong lên men rượu vang trái giác, nghiên cứu này nhằm đánh giá hoạt tính lên men của nấm men *Sac.* HG1.3 ở các thể tích khác nhau sau thời gian tồn trữ và thử nghiệm các điều kiện bảo quản rượu sau lên men.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Trái giác: Trái giác được thu mua tại các tỉnh Hậu Giang và Cà Mau. Trái giác được lựa chọn là những trái chín căng mọng, màu tím sẫm, không bị dập, hư hỏng và sâu bệnh. Nguyên liệu sau khi vận chuyển về phòng thí nghiệm được rửa sạch, loại bỏ cuống và ép lấy dịch quả.

Chuẩn bị dịch tăng sinh nấm men: Nấm men được phân lập từ trái giác và tồn trữ tại phòng thí nghiệm Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ [1]. *Sac.* HG1.3 được nuôi trong môi trường YPD lỏng (0,5% yeast

Evaluation of the fermentative activity of *Saccharomyces cerevisiae* HG1.3 and condition for threeleaf cayratia wine preservation

Thi Kieu Tien Doan¹, Ho Anh Trung Nguyen¹,
Nguyen Thuy Quynh Huynh¹, Thi Ngoc Mi Huynh¹,
Ngoc Thanh Nguyen², Xuan Phong Huynh^{2*}

¹Faculty of Biological, Chemical and Food Technology, Can Tho University of Technology,
256 Nguyen Van Cu Street, An Hoa Ward, Ninh Kieu District, Can Tho City, Vietnam

²Institute of Food and Biotechnology, Can Tho University,

3/2 Street, Xuan Khanh Ward, Ninh Kieu District, Can Tho City, Vietnam

Received 15 August 2023; revised 11 September 2023; accepted 14 September 2023

Abstract:

Threeleaf cayratia (*Cayratia trifolia* L.) is a wild climbing vine species that has potential raw material for wine production. Berries are green and turn purple when ripe, widely distributed in the Mekong delta provinces of Vietnam. This study aimed to investigate the threeleaf cayratia wine fermentation activity of *Saccharomyces cerevisiae* HG1.3 at the volumes of 1, 2, and 4 litres, along with examining the colour stability of the wine under different storage temperatures and packaging methods. The results showed that the fermentation volumes of 2 and 4 litres contained 12.37 and 12.45% (v/v) of ethanol contents, respectively. At the storage conditions of cool temperature (2-4°C) in the dark bottle, threeleaf cayratia wine has a stable colour and good sensory evaluation for colour and taste clarity after 4 weeks, with the optical transmittance value at 550 nm is 0.419%. In addition, threeleaf cayratia wine was clarified by the addition of 0.5% pectinase for 6 days after the fermentation period, then filtered and supplemented with 0.2% citric acid. The final product meets the Vietnamese standards (TCVN 3217-79 and TCVN 7045:2002).

Keywords: *Cayratia trifolia* L., *Saccharomyces cerevisiae* HG1.3, storage condition, threeleaf cayratia, wine.

Classification number: 4.6

extract, 0,5% peptone, 2% D-glucose). Môi trường nuôi cấy được khử trùng ở 121°C trong 15 phút, để nguội trước khi thêm chủng nấm men. Nấm men được ủ ở nhiệt độ phòng trên máy lắc 150 vòng/phút trong 48 giờ, kiểm tra mật số nấm men đạt 10^8 tế bào/ml bằng buồng đếm hồng cầu. Kiểm tra hoạt tính lên men rượu vang trái giắc của chủng nấm men ở thể tích 100 ml.

Đường sucrose được cung cấp bởi Công ty Cổ phần đường Biên Hòa (độ tinh khiết 99,8%).

Hoá chất: Sodium hydroxide, sodium hydrogen sunfite, acid citric là các sản phẩm thương mại được cung cấp bởi HiMedia (Ấn Độ) và Xilong Scientific (Trung Quốc).

2.2. Quy trình tổng quát sản xuất rượu trái giắc

Trái giắc chín → rửa sạch và để ráo → ép lấy dịch → lọc → pha loãng dịch quả với nước theo tỷ lệ 1:1 → điều chỉnh 22°Brix và 4,5 pH → thanh trùng bằng NaHSO_3 (140 mg/l) trong 2 giờ → bổ sung 1% (v/v) dịch tăng sinh nấm men vào dịch đã thanh trùng → lên men trong 11 ngày → lọc → bổ sung 0,5% pectinase (6 ngày) → lọc và bổ sung 0,2% acid citric → sản phẩm.

2.3. Thử nghiệm lên men rượu vang trái giắc ở các thể tích 1, 2 và 4 lít

Pha loãng dịch quả trái giắc và nước cất ở tỷ lệ 1:1. Điều chỉnh dịch pha loãng về hàm lượng chất khô hòa tan ở 22°Brix (bổ sung đường sucrose) và pH 4,5 (sử dụng acid citric và Na_2CO_3). Sau đó, bổ sung NaHSO_3 (140 mg/l), khuấy đều và để yên trong 2 giờ. Dịch tăng sinh nấm men *Sac.* HG1.3 được bổ sung vào với tỷ lệ cuối cùng là 1% v/v và lên men ở nhiệt độ phòng (28-30°C) trong 11 ngày.

2.4. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ và bao bì đến chất lượng rượu vang trái giắc

Sau lên men, sản phẩm được lọc và chiết vào chai thủy tinh trong và chai thủy tinh màu tối để đánh giá ảnh hưởng của ánh sáng đến sản phẩm. Đối với ảnh hưởng của nhiệt độ đến sản phẩm, rượu sau khi chiết vào chai được bảo quản ở nhiệt độ mát (2-4°C) và ở nhiệt độ phòng (28-30°C) trong 4 tuần.

2.5. Phân tích, đánh giá các chỉ tiêu sản phẩm

Giá trị pH được đo bằng pH kế (Hanna, Mỹ), hàm lượng chất khô hòa tan được đo bằng chiết quang kế (ATAGO, 0-33°Brix, Pháp), độ hấp thụ (A) và độ truyền quang (T) được đo ở bước sóng 550 nm bằng máy quang phổ UV-Vis (Biochrom Libra S70PC, Anh). Hàm lượng ethanol được đo bằng phương pháp chưng cất, cảm quan sản phẩm được đánh giá theo tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 3217:79 [6] và chỉ tiêu vi sinh được phân tích theo TCVN 7045:2002 [7].

2.6. Phân tích số liệu

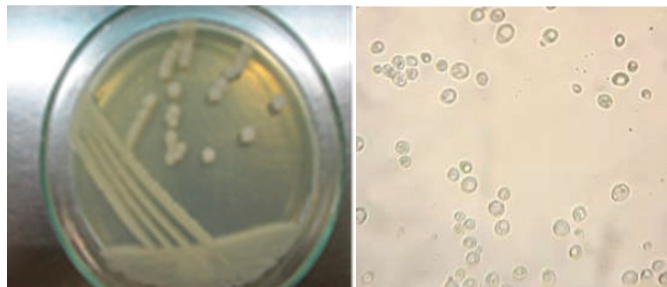
Tất cả các thí nghiệm được bố trí lặp lại 3 lần, số liệu thí nghiệm được phân tích ANOVA bằng phần mềm Statgraphics XVI và Minitab 17.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Đặc điểm và hoạt tính lên men của nấm men *Sac.* HG1.3 sau thời gian tồn trữ

Chủng nấm men *Sac.* HG1.3 được phân lập từ trái giắc và tồn trữ trong glycerol ở -20°C từ năm 2018 sau khi phân lập từ trái giắc. Sau thời gian tồn trữ nấm men được nuôi cấy và kiểm tra các đặc điểm hình thái cũng như hoạt tính lên men rượu trái giắc. Khuẩn lạc của *Sac.* HG1.3 hình tròn đều, màu trắng sữa, có độ nhô lên bề mặt khô và nhẵn (hình 1). Tế bào nấm men hình cầu nhỏ, có bào tử trứng, sinh sản bằng cách nảy chồi một hướng. Khảo sát hoạt tính lên men 100 ml rượu vang trái giắc

cho thấy sản phẩm có hàm lượng chất khô hoà tan là 7°Brix, pH 3,98 và hàm lượng ethanol đạt 9,5%. Các kết quả khảo sát của nấm men sau thời gian tồn trữ từ năm 2018 đến 2023 tương tự với kết quả phân lập ban đầu [1].



Hình 1. Khuẩn lạc và tế bào nấm men *S. cerevisiae* HG1.3 sau thời gian tồn trữ.

3.2. Kết quả thử nghiệm lên men của *Sac. HG1.3* ở thể tích 1, 2 và 4 lít

Thí nghiệm lên men rượu vang trái giắc 1, 2 và 4 lít và các thông số tối ưu với dòng nấm men là *Sac. HG1.3* đã được nghiên cứu là pH 4,5 và 22°Brix, lên men trong 11 ngày với mật độ chủng nấm men ban đầu là 10^8 tb/ml (bảng 1) [1].

Bảng 1. Kết quả lên men rượu vang trái giắc ở thể tích 1, 2 và 4 lít.

Thể tích (l)	Thử nghiệm		
	pH	°Brix	Độ cồn
1	4,22 ^a	8,00 ^b	10,20 ^e
2	4,34 ^a	7,17 ^c	12,37 ^d
4	4,25 ^a	8,00 ^b	12,45 ^d
Giá trị p	0,052	0,001	0,000

Số liệu là trung bình của 3 lần lặp lại. Trong các giá trị trung bình có các ký tự theo sau khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% ($p < 0,05$).

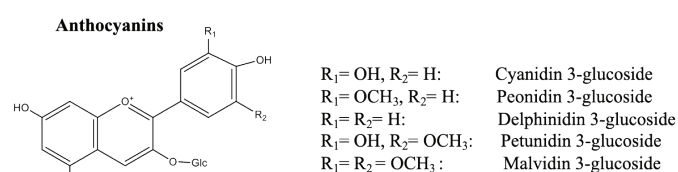
Rượu thành phẩm có hàm lượng ethanol ở 3 thể tích 1, 2 và 4 lít lần lượt là 10,20, 12,37 và 12,45% (v/v). Kết quả lên men rượu vang trái giắc với quy mô 1 lít cho thấy hàm lượng ethanol của rượu vang trái giắc tương tự như rượu vang mãng cầu xiêm (10% v/v) với cùng quy mô thể tích lên men 1 lít [8], nhưng thấp hơn rượu vang khóm (15% v/v) [9]. Sự khác biệt này có thể do ảnh hưởng của điều kiện lên men như thời gian, nhiệt độ, hàm lượng đường thêm vào, đặc biệt là nguyên liệu lên men ban đầu. Trên thực tế, nhiệt độ thích hợp để lên men rượu vang là 10-20°C cho rượu vang trắng và cao nhất 28°C cho rượu vang đỏ [10]. Kết quả lên men ở 100 ml và 1 lít cho thấy nấm men chịu nhiệt *Sac. HG1.3* vẫn có khả năng lên men tốt và ổn định ở nhiệt độ phòng (28-30°C) thay vì 35°C như trong các nghiên cứu trước [2, 3].

Ngoài ra, khảo sát lên men ở quy mô 2 và 4 lít còn cho thấy khả năng lên men ổn định của chủng nấm men chịu nhiệt *Sac. HG1.3* khi tăng thể tích dịch lên men với hàm lượng ethanol tạo ra thay đổi không đáng kể, khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức 5% (bảng 1).

Kết quả cảm quan cho thấy điểm trung bình cảm quan rượu vang trái giắc ở quy mô 2 lít ổn định trong các lần lặp lại, là cơ sở cho thử nghiệm lên men rượu vang trái giắc ở quy mô thể tích 4 lít. Ở quy mô 2 lít rượu có màu sắc và mùi được đánh giá cao, tuy nhiên vị lại không được tốt với điểm về độ trong và màu sắc, mùi, vị, mức độ yêu thích lần lượt là 4,35/5, 4,7/5, 3,65/5 và 3,5/5 điểm. Trong khi đó, sản phẩm lên men 4 lít đạt đánh giá cảm quan cao ở tất cả các chỉ tiêu đánh giá với số điểm với 4,8/5 điểm độ trong và màu sắc, 4,7/5 điểm mùi, 4,55/5 điểm vị và 4,5/5 điểm mức độ yêu thích. Nhìn chung, dù ở quy mô lên men thể tích khác nhau nhưng sản phẩm tạo ra vẫn đạt tiêu chuẩn của sản phẩm có cồn theo tiêu chuẩn Việt Nam về giá trị cảm quan. Qua đó, các kết quả khảo sát này góp một phần hoàn thiện quy trình lên men rượu vang trái giắc ở quy mô công nghiệp sử dụng chủng nấm men chịu nhiệt *Sac. HG1.3* mà nhóm nghiên cứu đang hướng đến.

3.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ và bao bì đến màu sắc và chất lượng rượu vang trái giắc

Màu sắc của rượu vang: Tỷ lệ hàm lượng polyphenol tổng có thể bị ảnh hưởng bởi những yếu tố khác nhau, chẳng hạn như sự thay đổi độ pH, oxy, hoạt động của enzyme, ánh sáng, nhiệt độ và sự hiện diện của các ion kim loại. Trong quá trình lão hóa của rượu vang, anthocyanin (hình 2) hình thành cùng với nhiều hợp chất khác như flavonol và acid hydroxycinnamic, liên kết phân tử hoặc phức hợp sắc tố chịu trách nhiệm về cảm nhận se, vị đắng và màu sắc của rượu vang đỏ [11]. Theo một nghiên cứu trước đây, rượu vang Cabernet Sauvignon được ủ trong thùng (tank), thùng gỗ và chai trong khoảng thời gian 2 năm đã đẩy nhanh đáng kể động học của các phản ứng phân hủy và biến đổi của anthocyanin cung cấp cho rượu vang một lượng bisulfite đậm đặc không thể tẩy trắng, nhưng ít hoặc không ảnh hưởng đến các đặc tính về khẩu vị và cảm nhận trong miệng của người dùng [12].



Hình 2. Một số chất anthocyanins có trong rượu vang đỏ [11].

Tỷ lệ suy thoái của anthocyanin tăng trong quá trình xử lý và bảo quản khi nhiệt độ tăng dẫn đến màu sắc của rượu bị thay đổi. Sự ổn định anthocyanin bị ảnh hưởng bởi nhiệt độ, các thành phần oxy hóa của môi trường phản ứng tiếp theo với anthocyanin làm phát sinh các sản phẩm không màu hoặc màu tối [13]. Khi tiếp xúc với ánh sáng và nhiệt độ càng nhiều, màu sắc của rượu vang càng có xu hướng chuyển sang màu sẫm hơn. Ảnh hưởng của ánh sáng đến màu sắc của rượu vang trái giắc được theo dõi bằng cách sử dụng chai trong hoặc chai màu tối để bảo quản rượu. Sự thay đổi về màu sắc của rượu được theo dõi qua giá trị độ hấp thụ (A) đo ở bước sóng 550 nm (bảng 2).

Bảng 2. Kết quả ảnh hưởng của nhiệt độ và ánh sáng đến độ hấp thụ (A) của rượu vang trái giác.

Nhân tố		Độ hấp thụ (A)				Giá trị p**
		Bao bì	Tuần 1	Tuần 2	Tuần 3	Tuần 4
Nhiệt độ mát (2-4°C)	Chai màu tối	0,418 ^{ab}	0,420 ^{ab}	0,415 ^{aa}	0,419 ^{ab}	0,0053
	Chai trong	0,444 ^{ba}	0,438 ^{ba}	0,441 ^{ba}	0,440 ^{ba}	0,0042
Nhiệt độ phòng (28-30°C)	Chai màu tối	0,442 ^{bc}	0,435 ^{ba}	0,439 ^{bb}	0,438 ^{baB}	0,0060
	Chai trong	0,473 ^{ca}	0,481 ^{ca}	0,552 ^{cb}	0,557 ^{cb}	0,0000
Giá trị p*		0,4949	0,0000	0,0000	0,0000	

Số liệu trung bình của 3 lần lặp lại. *: các chữ cái a, b, c... khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (5%) trong cùng một cột. **: các chữ cái A, B, C... khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (5%) trong cùng một hàng.

Với nghiệm thức nhiệt độ mát - trong chai màu tối rượu bảo quản có màu sáng và ổn định hơn (giá trị A là 0,418% sau tuần thứ nhất và 0,419% sau tuần thứ tư) so với nghiệm thức nhiệt độ mát - chai màu trong (giá trị A là 0,444% sau tuần thứ nhất và tăng lên 0,557% sau tuần thứ tư). Tuy nhiên, rượu bảo quản ở nhiệt độ mát - chai trong và ở nhiệt độ phòng - chai màu không có sự khác biệt lớn giữa hai mẫu qua các thời gian bảo quản, sau 4 tuần bảo quản với giá trị A (0,440% nhiệt độ mát - chai trong và 0,438% nhiệt độ phòng - chai màu tối). Việc thử nghiệm về ảnh hưởng của nhiệt độ đối với các thành phần hoá học trong rượu vang đỏ rất quan trọng, vì nó tác động đến sự lão hoá của rượu, làm giảm cảm quan và thời gian sử dụng nếu không bảo quản đúng cách [14]. Hầu hết các mẫu bảo quản ở nhiệt độ phòng - chai trong có độ hấp thụ cao nhất và tăng dần theo thời gian bảo quản, cho thấy được màu sắc của sản phẩm dễ bị biến đổi trong quá trình bảo quản. Các mẫu bảo quản ở nhiệt độ mát - chai màu có độ hấp thụ thấp nhất và tương đối ổn định theo thời gian, cho thấy sản phẩm ít bị biến đổi về màu sắc nhất.

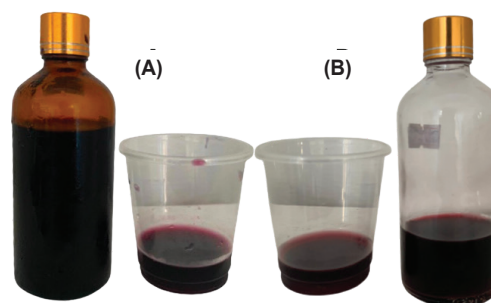
Chất lượng cảm quan và chỉ tiêu vi sinh vật: Rượu vang trái giác bảo quản ở các điều kiện khác nhau được đánh giá cảm quan về độ trong và màu sắc, mùi, vị và các chỉ tiêu vi sinh vật theo tiêu chuẩn Việt Nam [6, 7] (bảng 3). Theo kết quả ở bảng 3, các mẫu bảo quản ở nhiệt độ mát có giá trị cảm quan về độ trong và màu sắc tương đối ổn định theo thời gian tồn trữ. Ngược lại, các mẫu bảo quản ở nhiệt độ phòng có độ trong và màu sắc đạt giá trị cảm quan thấp hơn, giảm dần theo thời gian tồn trữ. Các mẫu đóng gói trong chai trong có khả năng tiếp xúc với ánh sáng và nhiệt độ cao hơn. Vì vậy, chất lượng cảm quan rượu đạt giá trị thấp hơn và thấp nhất sau 4 tuần là nghiệm thức nhiệt độ phòng - chai trong (2,8 điểm độ trong và màu sắc; 2,5 điểm mùi; 3,0 điểm vị). Trong khi đó, mẫu bảo quản ở nhiệt độ mát - chai màu đạt giá trị cảm quan tốt nhất sau 4 tuần với 4,5 điểm độ trong và màu sắc; 4,4 điểm mùi và 4,5 điểm vị. Có thể thấy rằng, màu sắc của mẫu rượu được bảo quản ở nhiệt độ mát - chai màu tối có màu sắc tươi sáng hơn mẫu được trữ ở

Bảng 3. Kết quả đánh giá cảm quan rượu vang trái giác ở các điều kiện bảo quản khác nhau.

Thời gian theo dõi	Nghiệm thức	Chỉ tiêu cảm quan			
		Bao bì	Độ trong và màu sắc	Mùi	Vị
Tuần 1	Nhiệt độ mát (2-4°C)	Chai trong	4,3 ^b	3,7 ^a	3,7 ^a
	Nhiệt độ mát (2-4°C)	Chai màu	4,5 ^b	3,8 ^a	3,9 ^a
	Nhiệt độ phòng (28-30°C)	Chai trong	3,8 ^a	3,7 ^a	3,7 ^a
	Nhiệt độ phòng (28-30°C)	Chai màu	4,2 ^{ab}	3,7 ^a	3,8 ^a
	Giá trị p		0,0148	0,9514	0,6897
Tuần 2	Nhiệt độ mát (2-4°C)	Chai trong	4,1 ^b	4,1 ^b	4,1 ^b
	Nhiệt độ mát (2-4°C)	Chai màu	4,3 ^b	4,0 ^b	4,0 ^b
	Nhiệt độ phòng (28-30°C)	Chai trong	3,5 ^a	3,3 ^a	3,5 ^a
	Nhiệt độ phòng (28-30°C)	Chai màu	4,0 ^b	3,8 ^b	3,5 ^a
	Giá trị p		0,0005	0,0001	0,0018
Tuần 3	Nhiệt độ mát (2-4°C)	Chai trong	4,0 ^b	4,0 ^c	3,9 ^b
	Nhiệt độ mát (2-4°C)	Chai màu	4,4 ^b	4,2 ^c	4,0 ^b
	Nhiệt độ phòng (28-30°C)	Chai trong	3,3 ^a	3,0 ^a	3,2 ^a
	Nhiệt độ phòng (28-30°C)	Chai màu	3,8 ^b	3,5 ^b	3,7 ^b
	Giá trị p		0,0000	0,0000	0,0001
Tuần 4	Nhiệt độ mát (2-4°C)	Chai trong	4,2 ^c	4,1 ^c	4,2 ^c
	Nhiệt độ mát (2-4°C)	Chai màu	4,5 ^c	4,4 ^c	4,5 ^c
	Nhiệt độ phòng (28-30°C)	Chai trong	2,8 ^a	2,5 ^a	3,0 ^a
	Nhiệt độ phòng (28-30°C)	Chai màu	3,7 ^b	3,5 ^b	3,6 ^b
	Giá trị p		0,0000	0,0000	0,0000

Số liệu trung bình của 3 lần lặp, các chữ cái giống nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5%.

chai trong (hình 3). Trong đồ uống có cồn, mùi thơm, hương vị và màu sắc dễ dàng bị xấu đi bởi các quá trình oxy hóa do ánh sáng. Khi bảo quản ở điều kiện lạnh thì hương vị rượu có mùi trái cây và tươi hơn, hàm lượng acid bay hơi thấp, hàm lượng glycerine sẽ tăng và ngược lại thì chất lượng rượu vang kém đi rõ rệt [15].

**Hình 3. Rượu vang trái giác sau 4 tuần bảo quản ở nhiệt độ mát (2-4°C). (A) Nhiệt độ mát - chai màu tối; (B) Nhiệt độ mát - chai trong.**

Bên cạnh đó, tất cả các mẫu rượu vang trái giác sau thời gian bảo quản ở các điều kiện khác nhau đều đảm bảo an toàn về các chỉ tiêu vi sinh vật theo tiêu chuẩn Việt Nam đối với rượu vang [7]. Từ đó có thể thấy, sản phẩm rượu vang trái giác

sau quá trình bảo quản đảm bảo được chất lượng vệ sinh an toàn thực phẩm, chỉ tiêu vi sinh vật không bị ảnh hưởng bởi nhiệt độ và ánh sáng sau 4 tuần khảo sát.

3.4. Chất lượng sản phẩm rượu vang trái giắc sau thời gian tồn trữ

Quá trình xử lý rượu sau lên men cũng là bước quan trọng trong quy trình lên men rượu. Rượu vang trái giắc được bổ sung 0,5% pectinase trong 6 ngày, lọc và thêm 0,2% acid citric trước khi chiết rót vào chai thủy tinh màu để bảo quản. Sau 6 tháng tồn trữ, kết quả kiểm tra vi sinh vật và hóa học nằm trong giới hạn cho phép theo tiêu chuẩn Việt Nam đối với rượu vang [7], hàm lượng ethanol đạt 11,97%, cảm quan đạt yêu cầu theo tiêu chuẩn Việt Nam [6] không có sự chênh lệch nhiều so với nồng độ ethanol của rượu vang trái giắc sau khi kết thúc quá trình lên men chính (bảng 4).

Bảng 4. Kết quả kiểm tra vi sinh và hóa học của rượu vang trái giắc.

Chỉ tiêu	Đơn vị	Kết quả
Tổng số vi sinh vật hiếu khí	CFU/ml	<1
Tổng số nấm men	CFU/ml	<1
Tổng số nấm mốc	CFU/ml	<1
Coliforms	CFU/ml	<1
<i>E. coli</i>	CFU/ml	<1
<i>Clostridium perfringens</i>	CFU/ml	<1
Ethanol	%	11,97
Methanol	%	Không có
Độ hấp thụ (A)	-	0,420
Độ truyền quang (T)	%	30,92
pH	-	3,80
Brix	-	7,00

Kết quả được kiểm tra tại Trung tâm Chất lượng Nông Lâm Thủy sản vùng 6.

4. Kết luận

Sac. HG1.3 là nấm men chịu nhiệt được phân lập từ trái giắc có khả năng lên men tốt ở nhiệt độ 35°C tạo ra sản phẩm rượu vang trái giắc được đánh giá cảm quan tốt và yêu thích của các đánh giá viên thử rượu. Chủng nấm men này được tồn trữ trong glycerol ở -20°C từ năm 2018 vẫn giữ ổn định hoạt tính lên men. Trong nghiên cứu này, hoạt tính lên men của nấm men *Sac. HG1.3* qua thời gian tồn trữ cũng cho thấy sự ổn định với các thể tích lên men khác nhau là 1, 2 và 4 lít ở nhiệt độ phòng, hàm lượng ethanol đạt 10,20-12,45% (v/v). Điều này khẳng định chủng nấm men cũng như điều kiện lên men có thể tiếp tục được nghiên cứu ở các quy mô thể tích lớn hơn từ đó định hướng cho quy mô sản xuất sản phẩm. Sản phẩm rượu được bảo quản ở nhiệt độ mát (2-4°C) trong chai thủy tinh màu tối cho thấy có sự ổn định về màu sắc, giá trị cảm quan về độ trong, mùi và vị tốt hơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] D.T.K. Tien, T.H.Y. Vien, H.D.L. Bui, et al. (2018a), "Selection of thermotolerant yeasts and application in wine production from three-leaf cayratia (*Cayratia trifolia* L.) in Hau Giang", *CTU Journal of Science*, **54(4B)**, pp.64-71 (in Vietnamese).
- [2] D.T.K. Tien, H.T.N. Mi, D.D. Nguyen, et al. (2018b), "Total polyphenol content and antioxidant capacity of *Cayratia trifolia* (L) Domin berries before and after fermentation using thermotolerant yeast *Saccharomyces cerevisiae* HG1.3", *Vietnam Journal of Science Technology - MOST*, **60(8)**, pp.60-44 (in Vietnamese).
- [3] D.T.K. Tien, H.T.N. Mi, T.T.T. Van, et al. (2022a), "Fermentation conditions, total polyphenol content, and antioxidant activity of threeleaf cayratia (*Cayratia trifolia* L.) wine prepared using thermotolerant yeast *Saccharomyces cerevisiae* HG1.3", *Asia-Pacific Journal of Science and Technology*, **27(6)**, DOI: 10.14456/apst.2022.88.
- [4] D.T.K. Tien, D.L. Khoa, H.T.N. Mi, et al. (2022b), "Preliminary on the fermentation of three-leaf cayratia (*Cayratia trifolia* L.) wine using *Saccharomyces cerevisiae* YB3K at room temperature", *TNU Journal of Science and Technology*, **227(14)**, pp.3-9, DOI: 10.34238/tnu-jst.6104 (in Vietnamese).
- [5] D.T.K. Tien, L.D.Q. Binh, H.T.N. Mi, et al. (2023), "Investigation of wine fermentation of three-leaf cayratia (*Cayratia trifolia* L.) using *Saccharomyces cerevisiae* 2.1", *F1000 Research*, **12**, DOI: 10.12688/f1000research.129075.2.
- [6] Ministry of Science and Technology (1979), *Food Products Sensorial Analysis Method by Fronting Mark. Vietnam National Standard 3215-79* (in Vietnamese).
- [7] Ministry of Science and Technology (2002), *Wine - Specification, Vietnam National Standard 7045:2002* (in Vietnamese).
- [8] D.T.K. Tien, D.T.T. Nhung, L.T. An, et al. (2021) "Isolation and selection of yeasts from soursop (*Annona muricata*) for wine fermentation", *Vietnam Journal of Science Technology - MOST*, **63(11)**, pp.53-57, DOI: 10.31276/VJST.63(11).53-57 (in Vietnamese).
- [9] N.V. Thanh, N.M. Thuy, T.T. Que, et al. (2013), "Using isolated and purified yeast for pineapple (Cau Duc, Hau Giang) wine processing", *CTU Journal of Science*, **27**, pp.56-63 (in Vietnamese).
- [10] A. Reynolds, M. Cliff, B. Ginard, et al. (2001), "Influence of fermentation temperature on composition and sensory properties of Semillon and Shiraz wines", *American Journal of Enology and Viticulture*, **52(3)**, pp.235-240, DOI: 10.5344/ajev.2001.52.3.23.
- [11] A. Sofia, S. Eygenia (2017), "Influence of storage conditions on the quality characteristics of wines", *EC Nutrition*, **8(3)**, pp.93-98.
- [12] A.G. Pozo, I. Arozarena, M.J. Noriega, et al. (2010), "Short- and long-term effects of micro-oxygenation treatments on the colour and phenolic composition of a cabernet sauvignon wine aged in barrels and/or bottles", *European Food Research and Technology*, **231(4)**, pp.589-601, DOI: 10.1007/s00217-010-1311-x.
- [13] M. Rein (2005), *Copigmentation Reactions and Color Stability of Berry Anthocyanin*, Academic Dissertation of Food Chemistry Division, University of Helsinki, Finland, 87pp.
- [14] F. Mattivi, P. Arapitsas, D. Perenzoni, et al. (2015), "Influence of storage conditions on the composition of red wines", *Advances in Wine Research*, pp.29-49, DOI: 10.1021/bk-2015-1203.ch003.
- [15] D.T.K. Tien, H.T.N. Mi, D.T.T. Nhung, et al. (2022), "The effectiveness of pectinase and stability of soursop (*Annona muricata*) wine quality during storage", *TNU Journal of Science and Technology*, **227(01)**, pp.43-50, DOI: 10.34238/tnu-jst.5165 (in Vietnamese).

Nghiên cứu ảnh hưởng kích thước mẫu cây tới khả năng tái sinh chồi trực tiếp trong sụn *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae) ở Việt Nam

Lê Thanh Tùng*, Phạm Thị Mát

Phòng Nghiên cứu Công nghệ Sinh học biển, Viện Nghiên cứu Hải sản, 224 Lê Lai, phường Máy Chai, quận Ngô Quyền, TP Hải Phòng, Việt Nam

Ngày nhận bài 12/7/2023; ngày chuyển phản biện 15/7/2023; ngày nhận phản biện 28/7/2023; ngày chấp nhận đăng 3/8/2023

Tóm tắt:

Tái sinh chồi trực tiếp là kỹ thuật sinh học được sử dụng để tạo ra một số lượng lớn cây rong sụn non từ cây mẹ. Trong thí nghiệm này, rong sụn *Kappaphycus alvarezii* có kích thước 0,25-2 cm được nuôi trong môi trường PES, bổ sung 5 mg/l Indole-3-acetic acid (IAA) kết hợp 1 mg/l N6-benzyladenine (BA). Sau 60 ngày thí nghiệm, kích thước mẫu cây có ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng tái sinh của rong sụn. Mẫu có kích thước 0,25 cm cho tỷ lệ sống và tái sinh thấp nhất (13,33±3,34%), lượng chồi trung bình đạt 3,08±0,14 chồi/mẫu với chiều dài chồi trung bình 1,16±0,56 mm. Mẫu có kích thước 0,75 cm cho hiệu quả tái sinh cao với thời gian hình thành chồi sớm nhất (sau 12 ngày nuôi cấy), tỷ lệ hình thành chồi đạt 83,33±3,34%, lượng chồi trung bình đạt 3,77±0,18 chồi/mẫu, chiều dài chồi trung bình 6,37±0,55 mm, tốc độ sinh trưởng đạt cao nhất 1,13±0,02%/ngày. Mẫu có kích thước 1,5 và 2 cm cho lượng chồi lớn nhất (8,05±0,32 ở mẫu 1,5 cm và 11,54±0,25 chồi/mẫu ở mẫu 2 cm), chiều dài chồi trung bình tương ứng đạt 1,45±0,27 và 1,21±0,12 mm, tốc độ sinh trưởng đạt 0,72±0,08% và 0,70±0,04%/ngày. Như vậy, mẫu kích thước 0,75 cm được xem là lựa chọn tốt nhất cho phương pháp nhân giống vô tính rong sụn *K. alvarezii*. Rong sau khi tái sinh chồi được chuyển sang bể ương có mức độ thích nghi tốt với tỷ lệ sống 100% và tốc độ tăng trưởng đạt 1,79±0,32%/ngày.

Từ khóa: *Kappaphycus alvarezii*, kích thước, nhân giống vô tính, rong biển, tái sinh chồi trực tiếp, tốc độ sinh trưởng.

Chỉ số phân loại: 4.6

1. Đặt vấn đề

Rong sụn *K. alvarezii* là đối tượng thủy sản có giá trị kinh tế, mang lại nguồn lợi và sinh kế bền vững cho bà con nghèo cộng đồng ven biển. Hiện nay, nhu cầu về sản lượng rong sụn cho ngành công nghiệp chế biến ngày càng tăng. Trong đó, các nhóm rong biển như *Kappaphycus* và *Eucheuma* chứa hàm lượng cao carrageenan được dùng làm nguyên liệu thô cho các ngành công nghiệp thực phẩm, dược phẩm và mỹ phẩm. Việc nuôi trồng và thương mại hóa nhóm rong biển này đang được phát triển ở nhiều nước thuộc khu vực Đông Nam Á như Philippines, Indonesia, Malaysia, Việt Nam và Campuchia [1].

Theo phương thức truyền thống, rong sụn *K. alvarezii* thường được nhân giống bằng phương pháp sinh dưỡng. Theo cách này, những cây rong bố mẹ được tách thành những bụi rong có khối lượng khoảng 100 g được cột vào dây và cố định vào giàn nuôi. Khi rong tăng trưởng gấp 3-4 lần khối lượng ban đầu thì tiếp tục được tách ra để nhân giống. Quá trình này lặp lại cho đến khi toàn bộ diện tích trồng được phủ bằng rong biển. Phương pháp nhân giống sinh dưỡng thông thường, rong biển được sử dụng dài ngày trên cùng một giống, dẫn đến suy giảm sức sống, giảm giá

trị sản phẩm và ngày càng giảm về năng suất sản lượng. Một số giải pháp khác nhằm cung cấp và phát triển nguồn giống rong biển như nhân giống bằng bào tử [2-4] hay nuôi cấy mô tế bào [5-13] được kỳ vọng mang lại lợi ích và đảm bảo tính bền vững cho ngành rong biển chứa hàm lượng cao carrageenan. Tuy nhiên, các phương pháp này còn tồn tại nhiều hạn chế. Quá trình sản xuất giống *Kappaphycus* và *Eucheuma* từ bào tử thường rất chậm và tốn thời gian do giai đoạn trưởng thành kéo dài [4]. Hơn nữa, phương thức sản xuất bằng bào tử mới dừng ở giai đoạn ban đầu về phát triển công nghệ do sự khó khăn về mùa vụ, khan hiếm cây rong bố mẹ mang bào tử. Các cá thể trưởng thành, cả thể nang và thể tứ bội cũng hiếm khi được tìm thấy trong tự nhiên như các loài rong khác [14]. Nuôi cấy mô tế bào rong biển được kỳ vọng nhiều hơn bởi khả năng tạo ra hàng loạt cây con cho nuôi trồng.

Trong khi sản xuất giống bằng bào tử hay nuôi cấy mô tế bào phát sinh mô sẹo đòi hỏi thời gian dài, chi phí cao và thường được sử dụng nhiều trong cải tạo, chọn lọc giống hơn trong sản xuất, nhân giống vô tính bằng phương pháp tái sinh chồi trực tiếp được xem như một giải pháp thực tế hơn, có thể sử dụng để tiết kiệm chi phí sản xuất [11].

*Tác giả liên hệ: Email: tungtrinh@gmail.com

Study on the effect of explant size on direct shoot regeneration capability of seaweed *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae) in Vietnam

Thanh Tung Lê*, Thi Mat Pham

Department of Marine Biotechnology, Research Institute for Marine Fisheries, 224 Le Lai Street, May Chai Ward, Ngo Quyen District, Hai Phong City, Vietnam

Received 12 July 2023; revised 28 July 2023; accepted 3 August 2023

Abstract:

Direct regeneration is a biological technique used to create a large quantity of seaweed seedlings from mother plants. In this experiment, *Kappaphycus alvarezii*, ranging in size 0.25–2.0 cm, was cultivated in a Provasoli's Enriched Seawater (PES) medium supplemented with 5 mg/l of Indole-3-acetic acid combined with 1 mg/l of N6-benzyladenine. After 60 days of the experiment, the size of the explant significantly affected the direct regenerative capability of *Kappaphycus alvarezii*. The 0.25 cm-sized explants showed the lowest survival and regeneration rates $13.33 \pm 3.34\%$, with an average shoot count of 3.08 ± 0.14 shoots/explant and an average shoot length of 1.16 ± 0.56 mm. The 0.75 cm-sized explants exhibited high regenerative efficiency, with the best shoot formation time (12 days of cultivation), a shoot formation rate of $83.33 \pm 3.34\%$, an average shoot count of 3.77 ± 0.18 shoots/explant, an average shoot length of 6.37 ± 0.55 mm, and the highest growth rate of $1.13 \pm 0.02\%$ per day. The 1.5 and 2 cm-sized explants produced the highest shoot count (8.05 ± 0.32 and 11.54 ± 0.25 shoots/explant, respectively), corresponding to an average shoot length of 1.45 ± 0.27 and 1.21 ± 0.12 mm, and growth rates of 0.72 ± 0.08 and $0.70 \pm 0.04\%$ per day, respectively. The results indicated that the 0.75 cm-sized explants are considered the best choice for the clonal propagation of *K. alvarezii* seaweed. The regenerated seaweed was then transferred to a nursery tank and showed a good adaptation with a survival rate of 100% and a growth rate of $1.79 \pm 0.32\%$ /day.

Keywords: clonal propagation, direct shoot regeneration, growth rate, *Kappaphycus alvarezii*, seaweed, size.

Classification number: 4.6

Nhân giống vô tính bằng phương pháp tái sinh chồi trực tiếp nhằm mục đích tạo ra cây giống có chất lượng tốt, tốc độ sinh trưởng tương đối nhanh, kháng bệnh và thích nghi tốt với điều kiện môi trường không thuận lợi. Đây là mục đích chính trong phát triển ngành công nghiệp rong biển. Quá trình sử dụng môi trường dinh dưỡng và các chất điều hòa sinh trưởng khác nhau được thử nghiệm ở rong biển *Kappaphycus* và *Eucheuma* [5, 6, 8, 9, 11, 15–17].

Việt Nam là một trong những nước đi sau về các công nghệ nuôi cấy mô rong biển. Tuy nhiên, đến nay phương pháp này đã tương đối thành công và được áp dụng trong sản xuất cây rong mầm trên loài rong sụn *K. alvarezii* và rong sủ *K. striatus*. Kỹ thuật nuôi cấy mô sẹo được tiến hành nhân giống thành công ở quy mô phòng thí nghiệm và được ứng dụng thực tế ngoài thực nghiệm. Cây rong nuôi cấy mô cho tốc độ sinh trưởng và khả năng kháng bệnh tốt hơn nhiều so với cây bố mẹ có nguồn gốc di nhập. Rong nuôi thương phẩm cho chất lượng và hàm lượng carrageenan đạt chất lượng làm rong nguyên liệu phục vụ công nghiệp chế biến [18, 19].

Cũng như các nghiên cứu rong biển trên thế giới, hiệu suất quy trình sản xuất cây rong mầm bằng phương pháp nuôi cấy mô tế bào phát sinh mô sẹo ở Việt Nam còn thấp, thời gian và chi phí vận hành cao. Tính ứng dụng của phương pháp này còn gặp nhiều hạn chế. Hiện nay, phương pháp sản xuất giống bằng tái sinh chồi trực tiếp được xem như một giải pháp thay thế, khả thi trong phát triển nguồn giống rong biển. Phương pháp này cho phép nhân giống hàng loạt, đồng bộ và tiết kiệm chi phí, thời gian sản xuất. Bởi vậy, nghiên cứu này được tiến hành nhằm đánh giá ảnh hưởng kích thước mẫu cấy tới hiệu quả tái sinh chồi trực tiếp trên cây rong sụn, từ đó phát triển phương pháp nhân nhanh cây giống rong sụn *in vitro* phục vụ mục tiêu sản xuất.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Thu mẫu và thuần hóa rong sụn

Thí nghiệm được tiến hành từ tháng 8/2022 đến tháng 2/2023. Mẫu rong sụn khỏe mạnh, có màu nâu sẫm, không bị bệnh và không có tảo bám, ký sinh được thu thập từ vùng biển Cà Ná, tỉnh Ninh Thuận và được chuyển về Phòng Thí nghiệm Công nghệ Sinh học biển, Viện Nghiên cứu Hải sản nhằm lưu giữ và cung cấp vật liệu cho các nghiên cứu nhân giống. Các bước lưu giữ rong được tiến hành theo nghiên cứu của E. Sulistiani và cs (2012) [10]. Cụ thể, rong sau khi rửa sạch được thuần hóa trong bể kính có dung tích 50 l với hệ thống lọc nước tuần hoàn và sục khí liên tục. Các bể kính được đặt dưới ánh sáng trắng đèn huỳnh quang với cường độ ánh sáng $35 \mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, chu kỳ chiếu

sáng L:D là 12:12 giờ, nhiệt độ được duy trì trong phòng điều hòa $25 \pm 1^\circ\text{C}$, môi trường nuôi được duy trì với độ mặn nước $30 \pm 2\text{‰}$. Nước biển được thay và bổ sung dinh dưỡng (PES 2%) hàng tuần.

2.2. Khử trùng vật liệu

Sau khoảng 2 tuần nuôi thuần hóa, các mẫu rong khỏe mạnh, không có tế bào biểu sinh được cắt (phân đoạn 3-5 cm) và sử dụng làm mẫu cấy. Các đoạn mẫu được làm sạch và khử trùng bề mặt bằng chất tẩy rửa lô hội (Earth choice Aloe Fresh, Úc) 0,5% và povidone iodine 2% trong thời gian 3 phút, sau đó rửa lại 3 lần bằng nước biển đã được hấp tiệt trùng để cung cấp các mẫu cấy sạch, khỏe mạnh và không có tảo ký sinh.

2.3. Thí nghiệm chiều dài mẫu cấy

Chiều dài mẫu cấy được thử nghiệm với các kích thước khác nhau: 0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 1,50 và 2,00 cm để lựa chọn kích thước tối ưu. Các mẫu cấy được cắt đồng nhất từ phần nhánh thân thứ cấp (phần nhánh từ sau thân chính và dưới chồi đỉnh) với 30 mẫu cắt phân đoạn trong một bình cầu đáy bằng 500 ml, chứa 300 ml nước biển đã vô trùng. Môi trường nuôi được bổ sung PES với nồng độ 2% và 5 mg/l Indole-3-acetic acid (IAA, Sigma Aldrich) kết hợp 1,0 mg/l N6-benzyladenine (BA, Sigma Aldrich) [9], sục khí liên tục. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần cho mỗi nhóm kích thước. Các bình thí nghiệm được thay nước một lần một tuần và bổ sung dinh dưỡng sau khi thay nước. Quan sát và theo dõi thí nghiệm 7 ngày một lần trong khoảng thời gian 60 ngày. Đặc điểm phát sinh hình thái, tỷ lệ mẫu tái sinh chồi trực tiếp (%), thời gian hình thành chồi, số chồi/mẫu và khối lượng mẫu (g) được theo dõi để đánh giá hiệu quả quá trình tái sinh chồi trực tiếp.

Điều kiện nuôi trồng được duy trì ổn định: ánh sáng trắng đèn huỳnh quang ở cường độ ánh sáng $35 \mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ với chu kỳ sáng tối L:D là 12:12 giờ, nhiệt độ $25 \pm 1^\circ\text{C}$, sục khí liên tục. Độ mặn nước biển nuôi rong duy trì $30 \pm 2\text{‰}$.

2.4. Ươm nuôi cây con trong bể kính

Sau khi hình thành chồi trong thời gian nuôi 60 ngày, mẫu cấy được chuyển sang ươm nuôi trong bể kính có thể tích 50 l. Điều kiện phòng thí nghiệm được duy trì ổn định: ánh sáng trắng đèn huỳnh quang với cường độ ánh sáng $35 \mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, chu kỳ sáng tối L:D là 12:12, nhiệt độ $25 \pm 1^\circ\text{C}$, sục khí liên tục. Độ mặn nước biển nuôi rong duy trì $30 \pm 2\text{‰}$. Thay nước hàng tuần và bổ sung môi trường nuôi (PES 2%) sau khi thay nước. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần trong thời gian 30 ngày. Tỷ lệ sống (%) và tốc độ tăng trưởng (%/ngày) được theo dõi để đánh giá hiệu quả của quá trình ươm giống.

Tốc độ tăng trưởng ngày và tỷ lệ sống áp dụng công thức tính của M.R.J. Luhan và cs (2010) [4].

$$\text{Tốc độ tăng trưởng ngày: GR} = (\ln W_t - \ln W_i) \times 100/t$$

trong đó, GR: tỷ lệ tăng trưởng ngày (%/ngày); W_i : trọng lượng tươi lúc bắt đầu nuôi (g); W_t : trọng lượng tươi sau t ngày nuôi thử nghiệm (g).

$$\text{Tỷ lệ sống: S} = (N_t/N_0) \times 100$$

trong đó: S: tỷ lệ sống (%); N_t : số mẫu rong thu hoạch; N_0 : số mẫu rong ban đầu.

2.5. Xử lý số liệu

Số liệu được nhập trên Microsoft Excel 2010 và phân tích bằng phần mềm SPSS Statistics 20. Sự khác biệt về sự sinh trưởng bao gồm thời gian hình thành chồi, tỷ lệ hình thành chồi, số lượng chồi trung bình cũng như tốc độ tăng trưởng ở các lô thí nghiệm được kiểm tra mối tương quan với hệ số tương quan LSD, phân tích với độ tin cậy 95% ($p < 0,05$).

3. Kết quả

3.1. Ảnh hưởng của kích thước mẫu đến sự hình thành chồi ở các mẫu cấy

3.1.1. Ảnh hưởng tới thời gian và đặc điểm hình thành chồi

Mẫu cấy sinh dưỡng kích thước khác nhau có thời gian hình thành chồi và đặc điểm phát triển khác nhau (bảng 1). Thời gian hình thành chồi sớm nhất là thời gian ghi nhận sự phát sinh chồi đầu tiên trong một lô thí nghiệm. Mẫu có thời gian hình thành chồi sớm nhất được ghi nhận ở lô mẫu kích thước 0,75 cm vào ngày thứ 12. Mẫu có thời gian hình thành chồi muộn nhất ghi nhận ở lô mẫu kích thước 0,25 cm vào ngày thứ 20. Tương tự, thời gian hình thành chồi trung bình được tính theo giá trị trung bình chung cho từng lô thí nghiệm. Ngoại trừ lô thí nghiệm có kích thước 0,25 cm cho thời gian hình thành chồi trung bình thấp, dao động khoảng $26,95 \pm 0,93$ ngày. Các lô thí nghiệm với các nhóm kích thước lớn hơn cho thời gian hình thành chồi không khác biệt có nghĩa về mặt thống kê ($p > 0,05$) và dao động trong khoảng $21,22 \pm 0,19$ đến $21,70 \pm 0,32$ ngày. Có sự khác biệt rõ rệt về đặc điểm hình thành chồi giữa các lô mẫu cắt kích thước khác nhau. Mẫu có kích thước dưới 1,0 cm hình thành chồi với số lượng thấp và chiều dài trung bình chồi ngắn, trong khi nhóm mẫu có kích thước trên 1,0 cm cho số lượng chồi nhiều hơn. Mẫu cắt có kích thước 0,75 cm có số lượng chồi không nhiều nhưng cho chiều dài chồi lớn, chồi to, mập và có màu nâu sẫm đặc trưng. Ngược lại, mẫu cắt có kích thước 1,0 và 1,5 cm có số lượng chồi nhiều nhưng chủ yếu chồi ngắn và nhỏ.

Bảng 1. Thời gian và đặc điểm hình thành chồi ở các nhóm kích thước mẫu cắt khác nhau sau 60 ngày nuôi cấy.

Kích thước mẫu (cm)	Thời gian hình thành chồi sớm nhất (ngày)	Thời gian hình thành chồi trung bình (n=30, ngày)	Mô tả đặc điểm hình thành chồi
0,25	20	26,95±0,93 ^a	Chồi ngắn, màu nâu đặc trưng và số lượng thấp
0,5	15	21,70±0,32 ^b	Chồi ngắn, màu nâu đặc trưng và số lượng thấp
0,75	12	21,09±0,16 ^b	Chồi to, mập, kích thước dài nhất, màu nâu đặc trưng và số lượng thấp
1,0	16	21,29±0,18 ^b	Chồi nhỏ, ngắn, màu nâu đặc trưng và số lượng thấp
1,5	16	21,22±0,19 ^b	Chồi nhỏ, ngắn, có màu nâu đặc trưng và số lượng nhiều
2,0	17	21,22±0,20 ^b	Chồi nhỏ, ngắn, có màu nâu đặc trưng và số lượng nhiều nhất

Các giá trị trung bình có các chữ cái khác nhau thể hiện sai khác có ý nghĩa ($p<0,05$), trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn (SD).

3.1.2. Ảnh hưởng tới tỷ lệ và số lượng chồi hình thành

Kết quả thí nghiệm cho thấy, các đoạn mẫu cắt có kích thước khác nhau cho tỷ lệ hình thành chồi, số lượng chồi và chiều dài chồi trung bình khác nhau rõ rệt (bảng 2). Về tỷ lệ mẫu hình thành chồi, mẫu cắt kích thước 0,75-1,00 cm cho tỷ lệ hình thành chồi tốt nhất đạt $83,33\pm 3,34$ và $82,22\pm 5,09\%$. Với các mẫu cắt kích thước 0,50 và 1,50 cm, tỷ lệ mẫu hình thành chồi đạt thấp hơn, lần lượt là $76,67\pm 6,67$ và $74,44\pm 5,09\%$. Khi mẫu cắt có kích thước quá lớn hay quá nhỏ, tỷ lệ hình thành chồi càng thấp, chỉ đạt $68,89\pm 6,94\%$ ở nghiệm thức 2,00 cm, thấp nhất là $13,33\pm 3,34\%$ ở nghiệm thức 0,25 cm.

Bảng 2. Tỷ lệ mẫu hình thành chồi và số lượng chồi trung bình ở các kích thước mẫu khác nhau sau 60 ngày nuôi cấy.

Kích thước mẫu (cm)	Tỷ lệ mẫu hình thành chồi (%)	Số lượng chồi trung bình (chồi)	Chiều dài chồi trung bình (mm)
0,25	13,33±3,34 ^d	3,08±0,14 ^c	1,16±0,56 ^c
0,5	76,67±6,67 ^b	3,35±0,31 ^c	2,21±0,23 ^b
0,75	83,33±3,34 ^a	3,77±0,18 ^c	6,37±0,55 ^a
1,0	82,22±5,09 ^a	3,37±0,09 ^c	1,98±0,42 ^b
1,5	74,44±5,09 ^b	8,05±0,32 ^b	1,45±0,27 ^c
2,0	68,89±6,94 ^c	11,54±0,25 ^a	1,21±0,12 ^c

Các giá trị trung bình có ký tự viết lên khác nhau trên cùng một cột thể hiện sai khác có ý nghĩa ($p<0,05$), trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn (SD).

Khác biệt với tỷ lệ hình thành chồi, số lượng chồi trung bình ở các nhóm mẫu cắt có xu hướng đạt tỷ lệ cao nhất ở nhóm mẫu có kích thước lớn nhất 2 cm ($11,54\pm 0,25$ chồi/mẫu) và 1,5 cm ($8,05\pm 0,32$ chồi/mẫu). Các nhóm mẫu có kích thước bé hơn 1,0 cm cho số lượng chồi thấp và khác biệt không có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm kết quả, dao động quanh ngưỡng trung bình 3-4 chồi/mẫu. Nhóm mẫu có kích thước

lớn từ 1,5 và 2 cm cho số lượng chồi nhiều, chiều dài chồi nhỏ, trung bình dao động 1,21-1,45 mm. Chiều dài chồi tốt nhất đạt kích thước trung bình 6,37 mm ở mẫu cắt 0,75 cm, cao gấp 3-4 lần so với chiều dài chồi của các nhóm còn lại.

3.1.3. Ảnh hưởng đến tốc độ sinh trưởng

Kết quả nghiên cứu cho thấy, kích thước mẫu cắt khác nhau cho tốc độ sinh trưởng khác nhau rõ rệt với mức ý nghĩa thống kê ($p<0,05$). Với mẫu có kích thước nhỏ nhất 0,25 cm có tốc độ sinh trưởng thấp nhất và mẫu bị chết nhiều trong quá trình nuôi cấy. Nhóm mẫu có kích thước lớn 1,5-2,0 cm cho tốc độ tăng trưởng chậm, tương ứng $0,72\pm 0,08\%/ngày$ và $0,70\pm 0,04\%/ngày$. Nhóm mẫu có kích thước 0,5 cm không có nhiều khác biệt về tốc độ sinh trưởng ($0,71\pm 0,17\%/ngày$) so với nhóm mẫu có kích thước lớn 1,5 cm. Mẫu có tốc độ sinh trưởng tốt nhất thuộc về nhóm có kích thước từ 0,75 và 1,0 cm. Tốc độ sinh trưởng hai mẫu này không khác biệt về mặt thống kê. Tuy nhiên, mẫu cắt có kích thước 0,75 cm cho tốc độ tăng trưởng trung bình cao nhất đạt $1,13\pm 0,02\%/ngày$.

Như vậy, kết quả nghiên cứu các chỉ tiêu phát sinh hình thái của mẫu rong sụn được nhân giống vô tính bằng phương pháp tái sinh chồi trực tiếp cho thấy, kích thước mẫu có ảnh hưởng rõ rệt đến quá trình hình thành chồi. Nhóm mẫu có kích thước 0,75 cm cho hiệu quả cao nhất với thời gian hình thành chồi nhanh nhất, chỉ sau 12 ngày nuôi cấy. Tỷ lệ hình thành chồi đạt $83,33\pm 3,34\%$, lượng chồi trung bình đạt $3,77\pm 0,18$ chồi/mẫu, chiều dài chồi trung bình $6,37\pm 0,55$ mm và tốc độ sinh trưởng cũng đạt ngưỡng cao nhất với $1,13\pm 0,02\%/ngày$ ở mẫu cắt này.

3.2. Kết quả thử nghiệm nuôi thích nghi cây con trong bể ương

Toàn bộ rong sụn thí nghiệm sau quá trình hình thành chồi, được chuyển qua giai đoạn nuôi thích nghi trong bể ương. Sau 30 ngày ương nuôi trong bể, toàn bộ mẫu rong sụn giống đều sống, đạt tỷ lệ 100%. Kết quả này cho thấy, rong sụn giống từ phương pháp nhân giống vô tính bằng phương pháp tái sinh trực tiếp cho sức sống và mức độ thích nghi cao (hình 3). Rong sụn giống có khả năng sinh trưởng, phát triển tốt, cây rong non có màu nâu sẫm, bóng đặc trưng. Tốc độ sinh trưởng đạt $1,79\%/ngày$. Số lượng chồi và chiều dài chồi tăng trung bình cao, lần lượt đạt 2,03 và 4,01 mm sau 30 ngày quan sát. Kết quả thử nghiệm nuôi cây con trong bể ương được trình bày trong bảng ở bảng 3 và hình 1.

Bảng 3. Sự phát triển của cây rong sụn non trong bể ương sau 30 ngày.

Chỉ tiêu theo dõi	Giá trị
Tỷ lệ mẫu sống (%)	100
Tốc độ sinh trưởng (%/ngày)	1,79±0,32
Số lượng chồi tăng trung bình	2,03±0,68
Chiều dài chồi tăng trung bình (mm)	4,01±0,91

Giá trị trình bày trong bảng là giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn SD.



Hình 1. Hình thái của cây con trong bể ươm sau thời gian 15 ngày (A) và 30 ngày trong bể ươm (B). Thước đo 2 cm.

4. Bàn luận

Trong nghiên cứu sản xuất giống rong biển, mọi nỗ lực đều hướng tới mục tiêu thiết lập quy trình cho sự phát triển và tăng trưởng. Các nghiên cứu cơ bản đều cố gắng tìm kiếm các điều kiện tối ưu và kinh tế nhất để thương mại hóa nguồn giống và mở rộng quy mô công nghiệp. Phương pháp nhân giống vô tính bằng tái sinh chồi trực tiếp được áp dụng trên cây rong sụn *K. alvarezii* tại Việt Nam nhằm xác định nhóm kích thước phù hợp, tiết kiệm chi phí trong sản xuất hàng loạt cây giống rong sụn. Kết quả ghi nhận về thời gian, đặc điểm hình thành chồi, tỷ lệ và số lượng hình thành chồi, tốc độ sinh trưởng của cây rong sụn non được theo dõi nhằm đánh giá hiệu quả quá trình này.

Kết quả nghiên cứu về chiều dài mẫu cấy cho thấy, nhân vô tính bằng tái sinh chồi trực tiếp là một phương pháp hiệu quả. Kích thước mẫu ban đầu có ảnh hưởng rõ rệt đến đặc điểm quá trình hình thành chồi ở rong sụn. Mẫu rong sụn với kích thước 0,75 cm cho tỷ lệ và chiều dài trung bình chồi tốt nhất trong số các nhóm kích thước mẫu cấy. Ở mẫu cấy này, thời gian bắt đầu xuất hiện chồi khá sớm, so với các nhóm kích thước còn lại. Mẫu rong này cũng cho tốc độ tăng trưởng và chiều dài chồi trung bình tốt nhất, tương ứng $1,13 \pm 0,02\%$ /ngày, $6,37 \pm 0,55$ mm. Ngược lại, nhóm mẫu có kích thước nhỏ 0,25 cm có tỷ lệ sống thấp ($13,33 \pm 3,34\%$) và hoàn toàn không phù hợp để sản xuất hàng loạt mẫu giống rong vô tính. Nhóm mẫu có kích thước lớn (1-2 cm) cho số lượng chồi tốt nhưng tỷ lệ hình thành chồi và tốc độ sinh trưởng không cao. Trong quá trình thích nghi, rong giống tạo ra từ phương thức tái sinh chồi trực tiếp có mức độ thích nghi cao và cho tốc độ sinh trưởng tốt, đạt $1,79 \pm 0,32\%$ /ngày ở bể ươm.

Nghiên cứu tái sinh chồi trực tiếp ở rong biển từng được nghiên cứu bởi các nhóm tác giả khác nhau. Thời gian bắt đầu hình thành chồi phụ thuộc nhiều vào nhiều yếu tố như: môi trường dinh dưỡng, chủng rong gốc được sử dụng làm nguyên liệu nhân giống và mật độ mẫu cấy... Theo D.A.T. Yunque và cs (2011) [17], mật độ mẫu cấy không ảnh hưởng đến tốc độ hình thành chồi nhưng có ảnh hưởng đến số lượng trung bình chồi được tạo ra từ mẫu cấy. Theo các tác giả này, chủng rong nâu (*K. alvarezii* adik-adik) được ươm trong môi trường AMPES (Acadian marine plant extract powder) + PGR (Plant growth regulators) có thời gian hình thành chồi sớm nhất sau 17 ngày, các chủng còn lại đều có thời gian

đâm chồi từ sau 21 ngày nuôi cấy [17]. So với AMPES, sử dụng môi trường PES + PGR trong giai đoạn nhân nhanh của nghiên cứu này có thời gian đâm chồi sớm hơn (12 ngày) và thời gian hình thành chồi trung bình ở các nhóm kích thước mẫu (16-17 ngày) cũng nhanh hơn nhiều. Sự ưu thế của PES so với các môi trường dinh dưỡng khác cũng được khẳng định trong nghiên cứu tối ưu hóa môi trường dinh dưỡng trong tái sinh trực tiếp giống rong biển rong sụn [11].

Nghiên cứu mô tả quá trình tái sinh trực tiếp từ mô phân sinh trong môi trường lỏng với rong mẫu có kích thước 2-3 cm [11] hoặc kích thước 0,5 cm [13] cho tốc độ tăng trưởng khá tốt. Một số nghiên cứu khác sử dụng kích thước mẫu cấy 0,5 cm [8] nhưng trên môi trường thạch rắn và phải mất nhiều thời gian hơn để tạo ra trụ mầm trong môi trường này cho tới khi đạt đến giai đoạn nuôi cấy vườn ươm trên biển. Trong nghiên cứu của M.R.J. Luhan và cs (2017) [13], rong biển *K. alvarezii* var. *tambalang* được chọn lọc tại vùng Libertad, Antique, Philippines có tỷ lệ sống và phát sinh chồi đạt 100%. Rong mẫu có kích thước 0,5 cm đạt tốc độ sinh trưởng cao nhất đến $1,6 \pm 0,06\%$ /ngày, là nhóm kích thước phù hợp để sản xuất hàng loạt các dòng vô tính. Theo nghiên cứu này, tốc độ sinh trưởng giữa nhóm mẫu có kích thước 0,3 và 0,5 cm không có sự khác biệt mang ý nghĩa về mặt thống kê. Tuy nhiên, nhóm kích thước 1,0 cm cho tốc độ tăng trưởng thấp hơn rõ rệt so với nhóm kích thước 0,5 cm [13]. Cũng bằng phương thức nhân giống vô tính bằng tái sinh chồi trực tiếp, nghiên cứu của W. Yong và cs (2014) [11] cho thấy tốc độ sinh trưởng lớn hơn rất nhiều lần. Theo đó, rong sụn *K. alvarezii* từ Semporna, Sabah, Malaysia được tiến hành nhân giống và tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy trong môi trường PES cho kết quả tối ưu nhất khi cho tốc độ tăng trưởng ($4,9 \pm 0,8\%$ /ngày) cao gấp 5 lần so với môi trường VS và F/2 (tương ứng $1,0 \pm 0,7$ và $0,9 \pm 0,3\%$ /ngày) [11]. Một số nghiên cứu khác cũng cho thấy khả năng phát sinh chồi khi nuôi trên các môi trường thạch rắn khác nhau [6, 8]. Tuy nhiên, mức độ phát triển của chồi trên thạch rắn mất nhiều thời gian hơn so với môi trường dịch lỏng, tính tới khi có thể sử dụng cây non cho công đoạn ươm trên biển.

Quá trình tái sinh chồi trực tiếp của rong sụn thông qua nhân giống vô tính thường phụ thuộc nhiều vào chủng giống, môi trường dinh dưỡng, tỷ lệ chất kích thích sinh trưởng và các điều kiện hóa lý [9, 20]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành xác định sự ảnh hưởng của các kích thước mẫu cấy đến khả năng tái sinh trực tiếp rong sụn *K. alvarezii* (Việt Nam) trong điều kiện phòng thí nghiệm. Kết quả nghiên cứu cho thấy tính khả quan của phương pháp nhân giống này thông qua các hệ số phát sinh chồi, tỷ lệ mẫu hình thành chồi và đặc biệt là tốc độ tăng trưởng. Đặc biệt, mẫu có kích thước 0,75 cm cho tốc độ tăng trưởng đạt $1,13 \pm 0,02\%$ /ngày, tỷ lệ mẫu sống khoảng $83,33 \pm 3,34\%$, tốt hơn nhiều so với các nhóm mẫu còn lại.

Nhìn chung, việc thử nghiệm nhân giống vô tính bằng phương pháp tái sinh chồi trực tiếp được chứng minh thành công đối với rong sụn *K. alvarezii* ở Việt Nam. Môi trường dinh dưỡng (PES) và chất điều hòa sinh trưởng thực vật (IAA:BA với tỷ lệ 5:1) được sử dụng trong nghiên cứu có thể áp dụng như các cơ chất tiêu chuẩn dùng trong nghiên cứu nuôi cấy mô và vi nhân giống rong biển. Kết quả nghiên cứu này có thể được sử dụng trong sản xuất và nhân giống rong biển theo hướng thương mại.

5. Kết luận

Rong sụn *K. alvarezii* đối tượng nuôi trồng thủy sản có giá trị kinh tế. Việc nhân giống và nuôi trồng loài rong sụn này đang nhận được nhiều sự quan tâm và nghiên cứu, đặc biệt là ứng dụng các phương pháp nhân giống kỹ thuật cao. Kết quả nghiên cứu cho thấy, kích thước mẫu có ảnh hưởng đáng kể đến khả năng tái sinh chồi trực tiếp của rong sụn trong môi trường phòng thí nghiệm. Dựa trên các tiêu chí đánh giá, mẫu có kích thước 0,75 cm cho hiệu quả tái sinh cao nhất. Sau 12 ngày nuôi cấy, mẫu này đạt tỷ lệ hình thành chồi $83,33 \pm 3,34\%$, lượng chồi trung bình đạt $3,77 \pm 0,18$ chồi/mẫu, chiều dài chồi trung bình $6,37 \pm 0,55$ mm và tốc độ sinh trưởng cao nhất $1,13 \pm 0,02\%/ngày$. Vì vậy, chúng tôi khuyến nghị lựa chọn mẫu có kích thước 0,75 cm cho phương pháp nhân giống bằng tái sinh chồi trực tiếp trên rong sụn *K. alvarezii*. Cây rong giống được tạo ra từ phương pháp này có tỷ lệ sống 100% và khả năng phát triển tốt trong bể ương thích nghi. Kết quả của nghiên cứu này cũng có thể là cơ sở khoa học áp dụng cho các loài rong tương tự và đóng góp vào việc nâng cao hiệu quả sản xuất, bảo đảm nguồn cung ổn định rong giống chất lượng cho nuôi trồng thủy sản.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] L. Hayashi, R.P. Reis, A.A.D. Santos, et al. (2017), "The cultivation of *Kappaphycus* and *Eucheuma* in tropical and sub-tropical waters", *Tropical Seaweed Farming Trends, Problems and Opportunities*, Springer, pp.55-90.
- [2] R.V. Azanza, T.T. Aliaza (1999), "In vitro carpospore release and germination in *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty from Tawi-Tawi, Philippines", *Botanica Marina*, **42**, pp.281-284, DOI: 10.1515/BOT.1999.031.
- [3] R. Azanza, E. Ask, A. Chapman, et al. (2003), "Kappaphycus alvarezii (Doty) Doty carposporeling growth and development in the laboratory", *Proceedings of The XVII International Seaweed Symposium*, Oxford University Press, pp.95-99.
- [4] M.R.J. Luhan, H. Sollesta (2010), "Growing the reproductive cells (carpospores) of the seaweed, *Kappaphycus striatum*, in the laboratory until out-planting in the field and maturation to tetrasporophyte", *Journal of Applied Phycology*, **22**, pp.579-585, DOI: 10.1007/s10811-009-9497-7.
- [5] C.J. Dawes, E. Koch (1991), "Branch, micropropagule and tissue culture of the red algae *Eucheuma denticulatum* and *Kappaphycus alvarezii* farmed in the Philippines", *Journal of Applied Phycology*, **3**, pp.247-257.
- [6] C.J. Dawes, G.C. Trono, A.O. Lluisma (1993), "Clonal propagation of *Eucheuma denticulatum* and *Kappaphycus alvarezii* for Philippine seaweed farms", *Hydrobiologia*, **260**, pp.379-383.

- [7] A.Q. Hurtado, D.P. Cheney (2003), "Propagule production of *Eucheuma denticulatum* (Burman) Collins et Hervey by tissue culture", *Botanica Marina*, **46**(4), pp.338-341, DOI: 10.1515/BOT.2003.031.
- [8] C.R.K. Reddy, G.R.K. Kumar, A.K. Siddhanta, et al. (2003), "In vitro somatic embryogenesis and regeneration of somatic embryos from pigmented callus of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty (Rhodophyta, Gigartinales)", *Journal of Phycology*, **39**(3), pp.610-616, DOI: 10.1046/j.1529-8817.2003.02092.x.
- [9] L. Hayashi, N.S. Yokoya, D.M. Kikuchi, et al. (2008), "Callus induction and micropropagation improved by colchicine and phytohormones in *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae)", *Journal of Applied Phycology*, **20**, pp.653-659, DOI: 10.1007/s10811-007-9234-z.
- [10] E. Sulistiani, D.T. Soelistyowati, Alimuddin (2012), "Callus induction and filaments regeneration from callus of cottonii seaweed *Kappaphycus alvarezii* (Doty) collected from Natuna Islands, Riau Islands Province", *Biotropia*, **19**(2), pp.103-114, DOI: 10.11598/btb.2012.19.2.254.
- [11] W. Yong, S. Ting, Y. Yong, et al. (2014), "Optimisation of culture conditions for the direct regeneration of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae)", *Journal of Applied Phycology*, **26**, pp.1597-1606, DOI: 10.1007/s10811-013-0191-4.
- [12] F.A.S. Neves, C. Simioni, Z.L. Bouzon, et al. (2015), "Effects of spindle inhibitors and phytohormones on the micropropagation of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales)", *Journal of Applied Phycology*, **27**, pp.437-445, DOI: 10.1007/s10811-014-0309-3.
- [13] M.R.J. Luhan, J.P. Mateo (2017), "Clonal production of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty in vitro", *Journal of Applied Phycology*, **29**, pp.2339-2344, DOI: 10.1007/s10811-017-1105-7.
- [14] M.R.J. Luhan (1996), "Biomass and reproductive states of *Gracilaria heteroclada* Zhang et Xia collected from Jaro, Central Philippines", *Botanica Marina*, **93**(1-6), pp.207-211, DOI: 10.1515/botm.1996.39.1-6.207.
- [15] J. Muñoz, A.C.C. López, R. Patiño, et al. (2006), "Use of plant growth regulators in micropropagation of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) in airlift bioreactors", *Journal of Applied Phycology*, **18**, pp.209-218, DOI: 10.1007/s10811-006-9105-z.
- [16] A.Q. Hurtado, D.A. Yunque, K. Tibubos, et al. (2009), "Use of Acadian marine plant extract powder from *Ascophyllum nodosum* in tissue culture of *Kappaphycus* varieties", *Journal of Applied Phycology*, **21**(6), pp.633-639, DOI: 10.1007/s10811-008-9395-4.
- [17] D.A.T. Yunque, K.R. Tibubos, A.Q. Hurtado, et al. (2011), "Optimisation of culture conditions for tissue culture production of young plantlets of carrageenophyte *Kappaphycus*", *Journal of Applied Phycology*, **23**, pp.433-438, DOI: 10.1007/s10811-010-9594-7.
- [18] V.T. Mo, T.V. Huynh, L.T. Nghia, et al. (2018) "Callus induction from branches of *Kappaphycus striatus* under different culture conditions", *Journal of Biotechnology*, **16**(2), pp.301-309 (in Vietnamese).
- [19] P.T. Mat, D.D. Thu, N.V. Nguyen (2019), "Research of tissue culture of cottonii seaweed *Kappaphycus alvarezii*", *Science and Technology Journal of Agriculture and Rural Development*, **12**, pp.124-131 (in Vietnamese).
- [20] P. Baweja, D. Sahoo, P.G. Jimenez, et al. (2009), "Seaweed tissue culture as applied to biotechnology: Problems, achievements and prospects", *Phycol. Res.*, **57**(1), pp.45-58, DOI: 10.1111/j.1440-1835.2008.00520.x.

QUY ĐỊNH VỀ BÀI BÁO ĐĂNG TẢI TRÊN TẠP CHÍ

Yêu cầu chung

Bài báo gửi đăng trên Tạp chí phải là bài báo nguyên thủy (chưa được công bố trước đó). Tác giả không được gửi đăng bài báo trên các tạp chí khác cho đến khi có quyết định xét duyệt của Ban Biên tập.

Bài báo dài không quá 10 trang (bao gồm cả bảng biểu, ghi chú, tài liệu tham khảo và phụ lục); font chữ: Times New Roman; cỡ chữ 13; khổ giấy A4, lề trên 2 cm, lề dưới 2 cm, lề trái 3 cm, lề phải 2 cm.

Bài báo gửi qua Hệ thống gửi bài trực tuyến tại địa chỉ https://b.vjst.vn/index.php/ban_b/about/submissions hoặc có thể gửi trực tiếp đến Tạp chí (Phòng 507, số 113 Trần Duy Hưng, phường Trung Hòa, quận Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam) hoặc qua hòm thư điện tử: khoahocvacongnghevietnam@most.gov.vn.

Cấu trúc của các loại bài báo khác nhau có thể thay đổi tùy theo loại hình nghiên cứu và nội dung của bài báo. Sau đây là chi tiết các thành phần chính của bài báo.

Tên bài báo

- Tên bài báo được viết bằng tiếng Việt và tiếng Anh, trên trang đầu của bài báo, in đậm, không gạch chân hay viết nghiêng.
- Tên bài báo phải ngắn gọn, rõ ràng và phù hợp với nội dung bài báo.
- Phía dưới tên bài báo là tên tác giả không viết chức danh và học hàm, học vị. Nếu có nhiều tác giả làm việc ở các cơ quan khác nhau thì tên tác giả được đánh số ^(1,2,...) ở phía trên. Dấu hoa thị (*) chỉ tác giả liên hệ, được viết ở cuối trang đầu tiên của bài báo.
- Khí liệt kê cơ quan công tác của tác giả, cần nêu rõ tên cơ quan và địa chỉ cơ quan (số nhà, tên đường, phường, quận, thành phố, quốc gia) bằng tiếng Việt và tiếng Anh.

Tóm tắt

Tóm tắt bằng tiếng Việt và tiếng Anh (khoảng 160-250 từ). Nêu được mục đích, phương pháp nghiên cứu chính, kết quả nghiên cứu và kết luận chủ yếu. Từ khóa bằng cả tiếng Việt và tiếng Anh theo thứ tự alphabet (ít nhất 3 từ khóa). Chỉ số phân loại (theo hướng dẫn).

1. Đặt vấn đề/Dẫn nhập/Mở đầu

Định nghĩa vấn đề; tóm lược vấn đề nghiên cứu đã được công bố trong và ngoài nước, nêu mục tiêu nghiên cứu và giải thích sự lựa chọn đề tài và mục tiêu nghiên cứu để thấy được tính thời sự, tính khoa học và sự cần thiết của vấn đề nghiên cứu.

2. Đối tượng/Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu cần trình bày tiêu chuẩn lựa chọn, đặc điểm đối tượng nghiên cứu. Phương pháp nghiên cứu cần nêu rõ cách tiếp cận nghiên cứu, loại hình nghiên cứu, phương pháp đo lường, công thức tính cỡ mẫu, phương pháp xử lý số liệu, mô tả kỹ các kỹ thuật tiến hành trong nghiên cứu; các quan điểm, lập luận, ý kiến tranh luận, các dẫn chứng...

3. Kết quả

Trình bày đầy đủ, khách quan các kết quả thu được sau nghiên cứu, các kết quả này phải phục vụ cho mục tiêu nghiên cứu. Các số liệu phải chính xác và khớp với nhau.

Phần kết quả nghiên cứu chỉ trình bày các kết quả nghiên cứu của đề tài, không giải thích, so sánh và bàn luận.

4. Bàn luận (phần này có thể gộp với phần kết quả)

Chủ yếu bàn luận các vấn đề liên quan đến mục tiêu đề tài. Nhận xét, đánh giá một cách khách quan các kết quả nghiên cứu, có so sánh với các tác giả khác để khẳng định hoặc phủ định những hiểu biết đã có, qua đó nêu được những điểm mới và đóng góp của đề tài. Dự báo hướng nghiên cứu tiếp và khả năng ứng dụng các kết quả nghiên cứu vào thực tiễn.

5. Kết luận

Nêu kết quả nghiên cứu chủ yếu của đề tài có tính khái quát liên quan đến mục tiêu nghiên cứu, đề xuất các vấn đề tiếp tục nghiên cứu.

LỜI CẢM ƠN (nếu có)

Tác giả cảm ơn các tổ chức/cá nhân đã tài trợ kinh phí hoặc hỗ trợ cho nghiên cứu.

Phụ lục (nếu có)

Đăng tải bảng số liệu, thông tin để hỗ trợ thêm cho nội dung bài báo.

Chú thích và tài liệu tham khảo

Chú thích được đánh số theo thứ tự xuất hiện ^(1,2,3,...) và được trình bày ngay ở cuối trang viết (footnote). Các tài liệu tham khảo được đánh số theo thứ tự xuất hiện để chỉ dẫn chúng được trích dẫn ở đâu trong bài báo. Số thứ tự được đánh trong ngoặc vuông, ví dụ: [3] với một hoặc [2, 5, 7-9] với nhiều số chỉ dẫn.

Lưu ý:

- Đối với trích dẫn trong bài báo: tài liệu tham khảo có nhiều hơn một tác giả chỉ để tên tác giả đầu tiên và cộng sự, viết tắt là cs, ví dụ: T.V. Nguyen và cs (năm xuất bản) [thứ tự trong danh mục tài liệu tham khảo].
- Đối với danh mục tài liệu tham khảo cuối bài: tài liệu tham khảo bằng tiếng Anh, các tài liệu không phải tiếng Anh cần được dịch sang tiếng Anh và chú thích ở cuối câu, ví dụ: (in Vietnamese), (in French)...
- Tài liệu tham khảo là các đường link cần bổ sung ngày truy cập.

Tác giả (Năm xuất bản), "Tên tài liệu được trích dẫn", *Tên nguồn*, **tập(số)**, trang/số trang/trang đầu-trang cuối (nếu có), số DOI (nếu có), URL (nếu có), ngày truy cập (ghi rõ ngôn ngữ nào nếu không phải tài liệu bằng tiếng Anh).

Tác giả: là tác giả/các tác giả của tài liệu được tham khảo, trích dẫn: liệt kê đầy đủ tên tác giả (chữ viết tắt đưa lên trước) với những tài liệu tham khảo có ≤3 tác giả; liệt kê 3 tác giả đầu tiên và theo sau là "et al." khi có từ 4 tác giả trở lên.

Năm xuất bản: năm xuất bản của tài liệu được tham khảo, trích dẫn.

Tên tài liệu được trích dẫn: là tên bài báo, chương/phần sách... (chỉ viết hoa chữ cái đầu, trừ tên riêng và sau dấu hai chấm), viết trong ngoặc kép.

Tên nguồn có thể là tên tạp chí, tên sách, hay tên tài liệu gốc của tài liệu được trích dẫn (phần này được *in nghiêng*), viết hoa chữ cái đầu tiên của mỗi từ chính.

Tập(số): dành cho nguồn trích là tạp chí, sách hoặc các xuất bản phẩm khác (phần này **in đậm**).

Trang/số trang/trang đầu cuối phần ảnh nơi cư trú của tài liệu được trích dẫn trong tài liệu nguồn.

Nếu có ≥2 tài liệu tham khảo do cùng tác giả đầu tiên và cùng năm công bố, thì các tài liệu tham khảo này cần được đánh dấu a, b... sau năm xuất bản (ví dụ: 1986a, 1986b...).

Nếu có một số tài liệu tham khảo có cùng 1 bài báo được trích dẫn có số trang khác nhau thì cần trích dẫn thêm số trang, ví dụ: A. Amber (1982, p.39).

Chi tiết vui lòng xem thêm tại: https://b.vjst.vn/index.php/ban_b/quy-dinh-bai-viet.

Các yêu cầu khác

- Bài viết không đạt yêu cầu, Toà soạn không trả lại bản thảo.
- Bài viết chỉ được đăng khi phản biện nhận xét về chất lượng bài báo đồng ý cho đăng.
- Bản quyền: tác giả đồng ý trao bản quyền bài viết (bao gồm cả phần tóm tắt) cho Ban Biên tập Tạp chí.

Quy định này áp dụng từ năm 2022 trở đi.

PHÂN LOẠI LĨNH VỰC KHOA HỌC

1. Khoa học tự nhiên

- 1.1. Toán học và thống kê
- 1.2. Khoa học máy tính và thông tin
- 1.3. Vật lý
- 1.4. Hóa học
- 1.5. Khoa học trái đất và môi trường
- 1.6. Khoa học sự sống
- 1.7. Khoa học nano
- 1.8. Khoa học tính toán
- 1.9. Các lĩnh vực khác của khoa học tự nhiên

2. Khoa học kỹ thuật và công nghệ

- 2.1. Kỹ thuật dân dụng; kỹ thuật kiến trúc; kỹ thuật xây dựng; kỹ thuật kết cấu và đô thị; kỹ thuật giao thông vận tải; kỹ thuật thủy lợi; kỹ thuật địa chất công trình
- 2.2. Kỹ thuật điện, kỹ thuật điện tử, kỹ thuật thông tin
- 2.3. Kỹ thuật cơ khí, chế tạo máy
- 2.4. Kỹ thuật hóa học
- 2.5. Kỹ thuật vật liệu và luyện kim
- 2.6. Kỹ thuật y học
- 2.7. Kỹ thuật môi trường
- 2.8. Công nghệ sinh học công nghiệp
- 2.9. Công nghệ nano
- 2.10. Kỹ thuật thực phẩm và đồ uống
- 2.11. Các lĩnh vực khác của khoa học kỹ thuật và công nghệ

3. Khoa học y - dược

- 3.1. Y học cơ sở
- 3.2. Y học lâm sàng
- 3.3. Y học dự phòng
- 3.4. Dược học
- 3.5. Các lĩnh vực khác của khoa học y - dược

4. Khoa học nông nghiệp

- 4.1. Trồng trọt
- 4.2. Chăn nuôi
- 4.3. Thú y
- 4.4. Lâm nghiệp
- 4.5. Thủy sản
- 4.6. Công nghệ sinh học trong nông nghiệp, thủy sản
- 4.7. Các lĩnh vực khác của khoa học nông nghiệp

5. Khoa học xã hội và nhân văn

- 5.1. Tâm lý học
- 5.2. Kinh tế và kinh doanh
- 5.3. Khoa học giáo dục
- 5.4. Xã hội học
- 5.5. Pháp luật
- 5.6. Khoa học chính trị
- 5.7. Địa lý kinh tế và xã hội
- 5.8. Thông tin đại chúng và truyền thông
- 5.9. Lịch sử và khảo cổ học
- 5.10. Ngôn ngữ học và văn học
- 5.11. Triết học, đạo đức và tôn giáo
- 5.12. Nghiên cứu về khu vực và quốc tế
- 5.13. Các lĩnh vực khác của khoa học xã hội và nhân văn

TẠP CHÍ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

Vietnam Journal of Science and Technology - MOST

Volume 66 - Number 5 - May 2024

Phân tích biểu hiện một số cytokine và yếu tố tăng trưởng tế bào trong dịch não tủy của bệnh nhân rối loạn cơ tròn, viêm tủy cắt ngang và liệt.

Thân Thị Trang Uyên, Trịnh Phương Đông, Nguyễn Thu Huyền, Hoàng Hương Diễm, Nguyễn Thanh Liêm

Hiệu quả nuôi ăn qua sonde bằng súp nhỏ giọt cho người bệnh tại Bệnh viện Hữu nghị Đa khoa Nghệ An.

Nguyễn Đức Phúc, Nguyễn Quỳnh Anh

Mối liên quan giữa kháng thể kháng Topoisomerase I với tổn thương một số cơ quan trong bệnh xơ cứng bì hệ thống tại Bệnh viện Da liễu Trung ương.

Đỗ Thị Thu Hiền, Nguyễn Thị Hoa, Nguyễn Thị Kim Tiên

Nghiên cứu chế tạo kit LAMP chẩn đoán sán lá gan nhỏ *Clonorchis sinensis* nhiễm trên người.

Phạm Thị Hà Trang, Trương Văn Hạnh, Trần Thanh Dương, Hoàng Đình Cảnh

Đánh giá tác dụng giảm đau của cao đặc chiết xuất từ Bìm bịp, Ngũ trảo, Thanh táo và Lá lốt trên thực nghiệm.

Nguyễn Thị Phương Thủy, Hứa Hoàng Oanh

Phân lập, tuyển chọn và đánh giá đặc tính các chủng *Bacillus* tiềm năng ứng dụng cho chế phẩm probiotic.

Đào Gia Bách, Đoàn Thị Thủy Linh, Lưu Thị Thủy Ngân, Lê Thị Hội

Các tiếp cận quản lý danh sách người bệnh chờ ghép thận.

Hoàng Giang, Trịnh Hồng Sơn, Phạm Việt Cường

Mô hình bệnh tật tại Khoa Y học Cổ truyền một số bệnh viện huyện tỉnh Quảng Bình.

Nguyễn Tuấn Linh, Đoàn Quang Huy

Ảnh hưởng của một số loại phân hữu cơ đến sinh trưởng, năng suất và chất lượng dưa chuột (*Cucumis sativus* L.) trồng tại Vĩnh Phúc trong điều kiện nhà lưới.

Phan Thị Thu Hiền, Nguyễn Thị Ngọc Dinh, Lê Thị Tuyết Châm

Ảnh hưởng của thời vụ đốn nuôi hom, bón phân và tỉa cành đến năng suất hom giống Sớ cam (*Camellia oleifera* Abel).

Lê Tắt Khang, Phạm Văn Ngân, Nguyễn Văn Lam, Nguyễn Phương Tùng, Đinh Thị Ngọc, Lê Thành Phương, Nông Quang Thiện

Nhân giống *in vitro* cây lan Hoàng thảo U lồi (*Dendrobium wardianum*).

Nguyễn Thị Lại, Nguyễn Thị Bình, Nguyễn Thị Ngọc Bích, Phạm Minh Khoa

Xác định đa dạng di truyền bằng chỉ thị phân tử và khả năng tái sinh chồi *in vitro* của các giống dâu tây tại Lâm Đồng.

Nguyễn Bá Nam, Lương Vũ Mai Quỳnh, Lê Trịnh Huy Trà, Lê Ngọc Triệu, Nguyễn Văn Bình, Phan Hoàng Đại, Lê Thế Biên, Trần Hiếu, Hoàng Thanh Tùng, Dương Tấn Nhựt

Hiệu quả hiệp đồng kháng nấm gây hại vật liệu gỗ của hoạt chất preventol, α -bromo-cinnamaldehyde và đồng sunfat.

Nguyễn Vũ Hùng, Trần Khánh Linh, Nguyễn Thị Thanh Lợi, Lê Trọng Tài, Ngô Cao Cường

Đánh giá khả năng lên men của *Saccharomyces cerevisiae* HG1.3 và điều kiện bảo quản rượu vang trái giác.

Đoàn Thị Kiều Tiên, Nguyễn Hồ Anh Trung, Huỳnh Nguyễn Thủy Quỳnh, Huỳnh Thị Ngọc Mi, Nguyễn Ngọc Thanh, Huỳnh Xuân Phong

Nghiên cứu ảnh hưởng kích thước mẫu cấy tới khả năng tái sinh chồi trực tiếp rong sụn *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae) ở Việt Nam.

Lê Thanh Tùng, Phạm Thị Mát

1 Analysis of expression level of several cytokines and growth factors in cerebrospinal fluids extracted from spina bifida, transverse myelitis, and paralysis.

Thi Trang Uyen Than, Phuong Dong Trinh, Thu Huyen Nguyen, Huong Diem Hoang, Thanh Liem Nguyen

7 Effectiveness of enteral tube feeding by gravity drip soup for patients at Nghe An General Friendship Hospital.

Duc Phuc Nguyen, Quynh Anh Nguyen

12 Association between anti-Topoisomerase I antibody and organ damage in systemic sclerosis at the National Hospital of Dermatology and Venereology.

Thi Thu Hien Do, Thi Hoa Nguyen, Thi Kim Tien Nguyen

18 Study on producing a LAMP kit for diagnosis of small liver fluke *Clonorchis sinensis* infection in humans.

Thi Ha Trang Pham, Van Hanh Truong, Thanh Duong Tran, Dinh Canh Hoang

24 Analgesic effects of semi-solid extract from four medicinal herbs (*Clinacanthus nutans* (Burm. f.) Lindau, *Vitex negundo* L., *Justicia gendarussa* L., *Piper lolot* L.) in mice.

Thi Phuong Thuy Nguyen, Hoang Oanh Hua

29 Isolation, selection, and evaluation of characteristics of potential *Bacillus* strains for probiotic products.

Gia Bach Dao, Thi Thuy Linh Doan, Thi Thuy Ngan Luu, Thi Hoi Le

34 Approaches to managing the list of patients waiting for kidney transplantation.

Giang Hoang, Hong Son Trinh, Viet Cuong Pham

40 Disease models of traditional medicine departments of some district hospitals in Quang Binh province.

Tuan Linh Nguyen, Quang Huy Doan

43 Effects of some types of organic fertilisers on growth, yield and quality of *Cucumis sativus* L. grown in Vinh Phuc province under greenhouse conditions.

Thi Thu Hien Phan, Thi Ngoc Dinh Nguyen, Thi Tuyet Cham Le

48 Effect of cutting propagation time, fertilizer applied and pruning technique on productivity of tea-oil-plant (*Camellia oleifera* Abel).

Tat Khang Le, Van Ngan Pham, Van Lam Nguyen, Phuong Tung Nguyen, Thi Ngoc Dinh, Thanh Phuong Le, Quang Thien Nong

52 *In vitro* propagation of the *Dendrobium wardianum*.

Thi Lai Nguyen, Thi Binh Nguyen, Thi Ngoc Bich Nguyen, Minh Khoa Pham

57 Genetic diversity analysis using molecular markers and *in vitro* shoot regeneration of strawberry cultivars in Lam Dong.

Ba Nam Nguyen, Vu Mai Quynh Luong, Trinh Huy Tra Le, Ngoc Trieu Le, Van Binh Nguyen, Hoang Dai Phan, The Bien Le, Hieu Tran, Thanh Tung Hoang, Tan Nhut Duong

64 Synergistic antifungal effect of preventol, α -bromo-cinnamaldehyde, and copper sulfate compounds against wood harmful fungi.

Vu Hung Nguyen, Khanh Linh Tran, Thi Thanh Loi Nguyen, Trong Tai Le, Cao Cuong Ngo

70 Evaluation of the fermentative activity of *Saccharomyces cerevisiae* HG1.3 and condition for threeleaf cayratia wine preservation.

Thi Kieu Tien Doan, Ho Anh Trung Nguyen, Nguyen Thuy Quynh Huynh, Thi Ngoc Mi Huynh, Ngoc Thanh Nguyen, Xuan Phong Huynh

75 Study on the effect of explant size on direct shoot regeneration capability of seaweed *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae) in Vietnam.

Thanh Tung Le, Thi Mat Pham